



**Панель генетических маркеров
для прогнозирования развития
сухого кератоконъюнктивита
при ревматоидном артрите и болезни Шегрена**

Г.В. Зайцева, Т.Н. Сафонова, А.М. Бурденный, В.И. Логинов

Москва, 2021

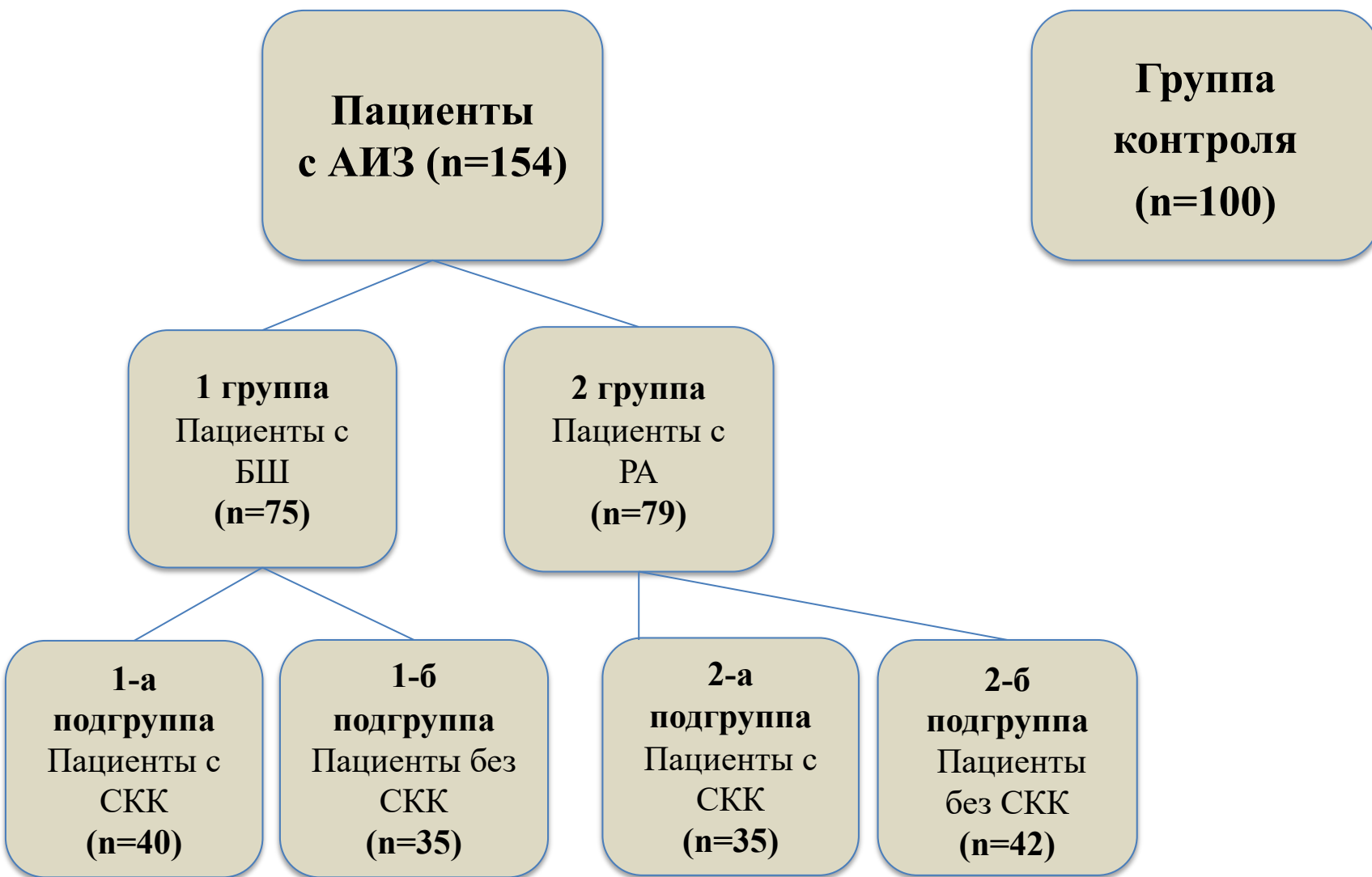
Актуальность

- Распространенность сухого кератоконъюнктивита (СКК) достигает 5-50% среди офтальмологических больных (Dry Eye Workshop; 2017).
- В 25-30% случаев СКК является одним из офтальмологических проявлений РА и может определять степень его активности, так же является экспертным признаком постановки диагноза БШ, который констатируют у 80-90% пациентов (Zlatanović G., Veselinović D., et al., 2010).
- СКК, ассоциированный с системными аутоиммунными заболеваниями (АИЗ), характеризуется наиболее тяжелым течением (Т.Н. Сафонова и соав., 2013).
- Манифестация АИЗ может начаться с поражения органа зрения, ухудшая тем самым качество жизни больных (Subbarayal B. et al., 2016, Daguano C. et al., 2011).
- Доказана взаимосвязь развития БШ и РА с полиморфными маркерами генов *THBS1*, *GTF2I*, *MUC1*, *TRIM21*, *STAT4*, *PTPN22* (S. Raychaudhuri et al., 2013, JJ. Huang et al., 2012; MR. Spalinger et al., 2016; K. Mehla et al., 2014). Ассоциативной связи полиморфных маркеров с повреждением глазной поверхности при данных АИЗ установлено не было.
- Изучение генетических основ СКК при АИЗ позволит дополнить диагностический алгоритм и стать основанием для разработки генно-инженерной терапии этих заболеваний.

Цель исследования

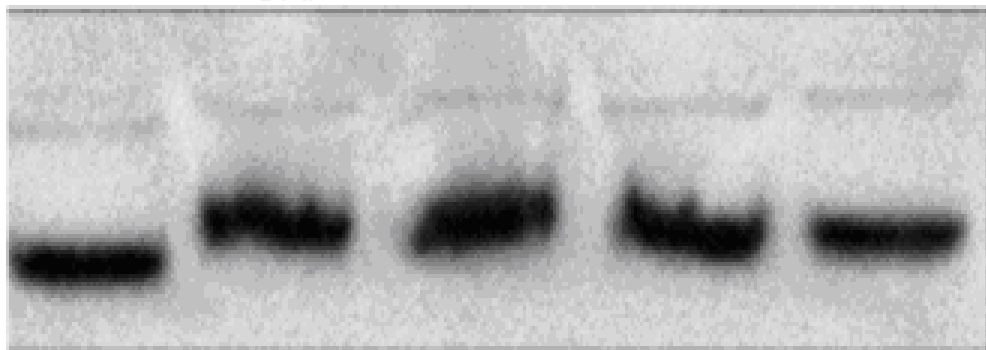
- создание панели генетических маркеров для диагностики сухого кератоконъюнктивита при ревматоидном артрите и болезни Шегрена

Материал и методы клинического исследования

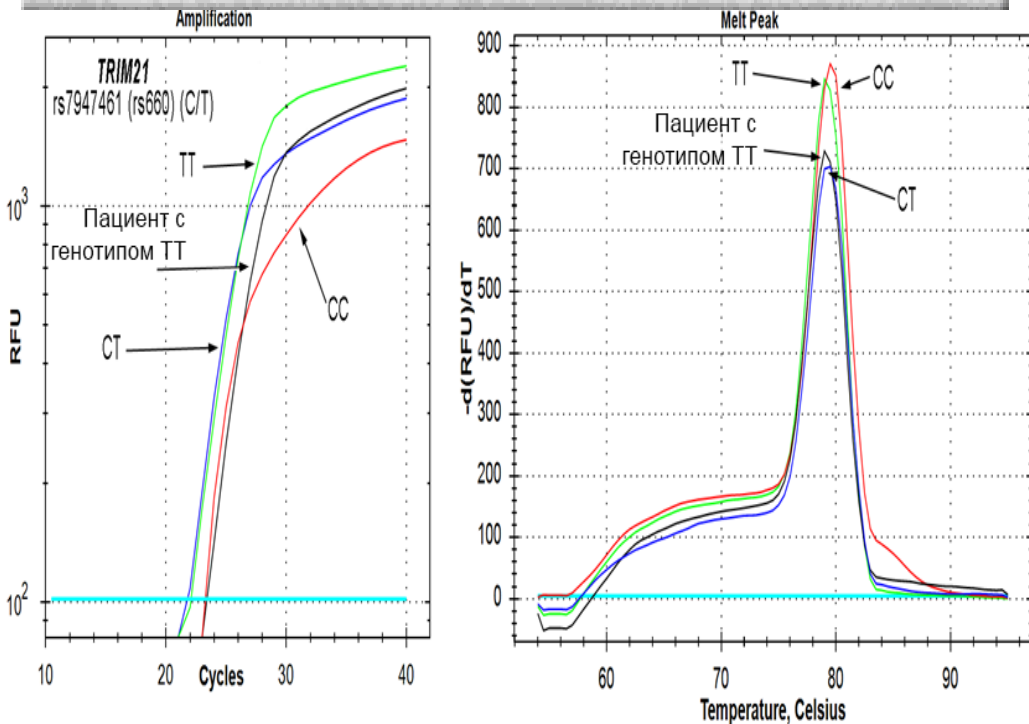


Метод генетического исследования

1 2 3 4 М

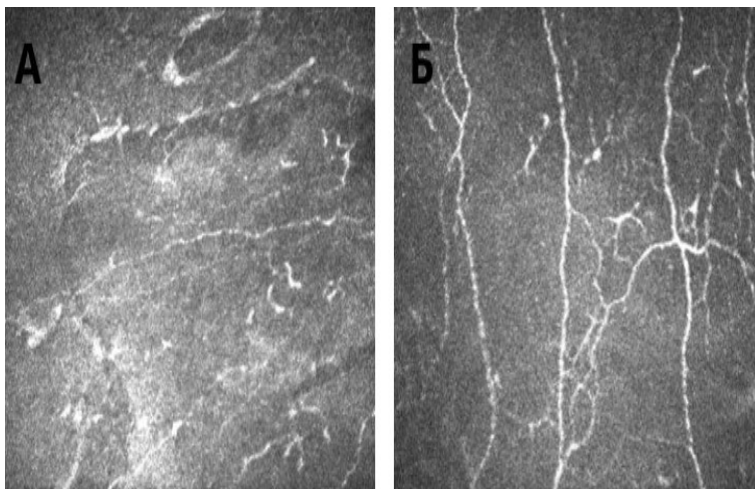


I этап. Выделение ДНК.
Электрофоретическое разделение препаратов ДНК в 0.8% агарозном геле. М – маркер фаг λ .



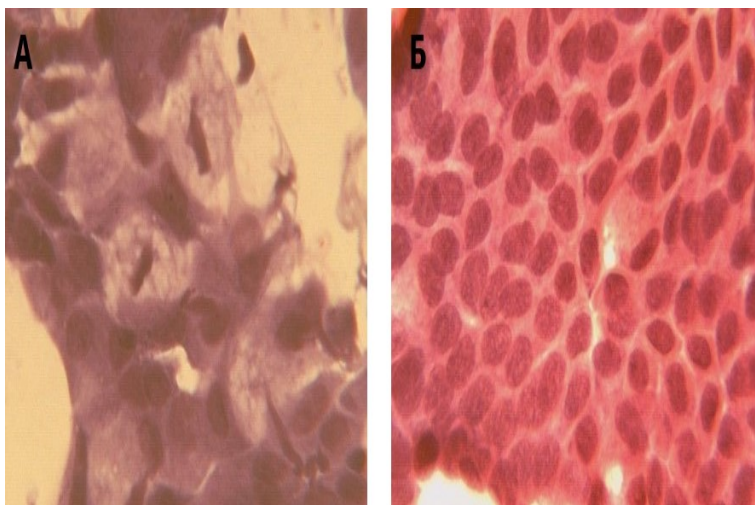
II этап. Анализ полиморфного маркера *rs7947461* гена *TRIM21* методом анализ кривых плавления ДНК. Слева – кинетические кривые амплификации фрагмента ДНК. Справа – температурные кривые плавления продукта амплификации фрагмента ДНК. CC – верхняя (нормальная) гомозигота; CT – гетерозигота; TT – нижняя (мутантная) гомозигота.

Результаты морфологического исследования пациентов с БШ



Сканограммы НРТ. А - пациента с СКК. Ход и структура НВР нарушены, НВР разнонаправленно ориентированы, «четкообразные», истончены. Отмечена выраженная извитость, снижение их количества. Увеличено количество клеток Лангерганса.

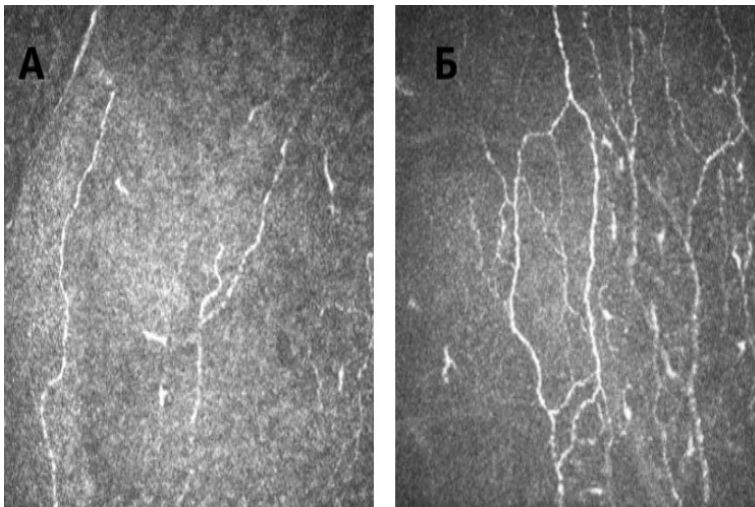
Б - пациента без СКК. НВР местами извиты, вытянуты, четкие, хорошо контрастируют на тёмном фоне. Количество НВР не изменено.



Импрессионно-цитологическое исследование конъюнктивы. (Окраска по Романовскому-Гимзе, ув. 400). А – пациента с СКК. Микровезикуляция цитоплазмы, бесклеточные зоны, межклеточные границы расширены, «прообраз бокаловидных клеток», умеренная лейкоцитарная инфильтрация;

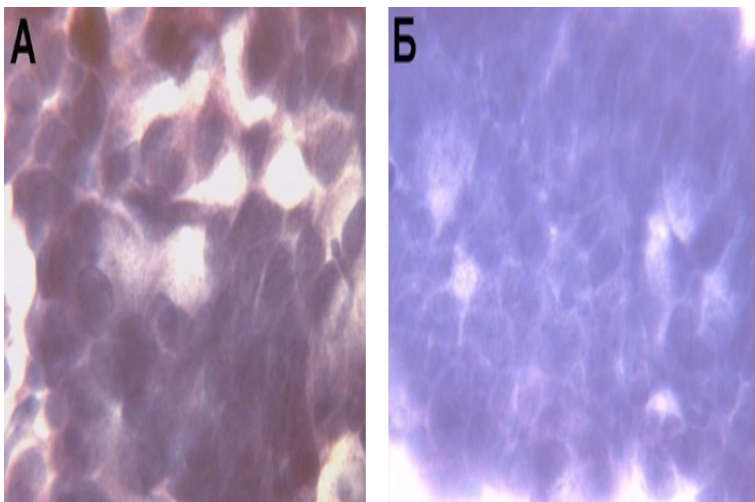
Б - пациента без СКК. Относительно нормальная архитектура эпителия конъюнктивы со снижением плотности бокаловидных клеток.

Результаты морфологического исследования пациентов с РА



Сканограммы НРТ. А - пациента с СКК. НВР извиты, разнонаправлены, «чёткообразной» формы, незначительно истончены. Количество НВР уменьшено.

Б - пациента без СКК. НВР извиты, разнонаправлены, местами «чёткообразные», смыкаются друг с другом, образуя замкнутые овальные фигуры. Количество НВР не изменено.



Импрессионно-цитологическое исследования конъюнктивы. (Окраска по Романовскому-Гимзе, ув. 400). А - пациента с СКК. Клеточный поли- и плеоморфизм, бесклеточные участки, нечеткие границы ядер, гомогенизированная отечная цитоплазма. Практически полное отсутствие бокаловидных клеток.

Б – пациента без СКК. Клеточный полиморфизм, расширенные межклеточные границы с нечеткими контурами ядер. Снижение и неравномерное распределение бокаловидных клеток, часто в редуцированном состоянии.

Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs4144331* гена *TRIM21* у пациентов с/без СКК на фоне БШ и контрольной группы

Полиморфный маркер	Генотипы	Пациенты с БШ n = 75	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>rs4144331</i>	CC	0.400	0.650	33.79	5.0×10^{-8}	0.23	0.14–0.32
	CA	0.225*	0.330			0.38	0.33–0.66
	AA	0.375	0.020			4.19	2.38–7.37
Полиморфный маркер	Генотипы	Пациенты 1-а подгруппы n = 40	Пациенты 1-б подгруппы n = 35	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>rs4144331</i>	CC	0.453	0.650	27.13	1.0×10^{-6}	0.31	0.19–0.41
	CA	0.253*	0.330			0.49	0.42–0.75
	AA	0.293	0.020			3.19	1.97–5.17

*распределение частот не соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

**Распределение частот генотипов полиморфных маркеров
rs915956, rs7947461, rs4144331 гена TRIM21
у пациентов с СКК на фоне РА и контрольной группы**

Полиморфный маркер	Генотипы	Пациенты 2-а n = 37	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>rs4144331</i>	CC	0.460	0.650	21.26	2.0x10 ⁻⁵	0.33	0.19–0.40
	CA	0.270*	0.330			0.53	0.41 – 0.90
	AA	0.270	0.020			3.00	1.67 – 5.39
<i>rs915956</i>	CC	0.324	0.670	17.81	0.0001	0.25	0.14–0.41
	CT	0.324*	0.240			0.70	0.44–1.20
	TT	0.351	0.090			3.97	2.25–7.01
<i>rs7947461</i>	CC	0.324	0.480	25.26	3.0x10 ⁻⁶	0.32	0.16 – 0.44
	CT	0.189*	0.420			0.28	0.19 – 0.52
	TT	0.486	0.100			3.09	1.78 – 5.35

*распределение частот не соответствует равновесию Харди-Вайнберга

**Распределение частот генотипов полиморфных маркеров
rs915956, rs7947461, rs4144331 гена TRIM21
у пациентов с/без СКК на фоне РА**

Полиморфный маркер	Генотипы	Пациенты 2-а n = 37	Пациенты 2-б n = 42	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>rs915956</i>	CC	0.324	0.595	10.70	0.0048	0.30	0.15 – 0.38
	CT	0.324*	0.333			0.55	0.39 – 1.05
	TT	0.351	0.071			3.38	1.71 – 6.65
<i>rs7947461</i>	CC	0.324	0.500	20.56	3.0x10 ⁻⁵	0.27	0.12 – 0.44
	CT	0.189*	0.452			0.23	0.16 – 0.53
	TT	0.486	0.048			3.68	1.89 – 7.16
<i>rs4144331</i>	CC	0.444	0.480	10.47	0.005	0.63	0.34 – 0.79
	CA	0.278*	0.420			0.52	0.41 – 0.97
	AA	0.278	0.100			1.60	1.03 – 2.47

*распределение частот не соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

Г.В. Зайцева, Т.Н. Сафонова, А.М. Бурденный, В.И. Логинов, 2021

Анализ полиморфного маркера *rs4072037* гена *MUC1* у пациентов с БШ и РА

Количество баллов	1	2	3
<i>MUC1</i> <i>rs 4072037</i> (A/G)	AA	AG	GG
Тест Ширмера I	15-10 мм	9-5 мм	менее 5 мм
Проба Норна	15-10 сек	9-5сек	менее 5 сек
Импрессионная цитология конъюнктивы	Эпителий конъюнктив	Эпителий конъюнктив	Эпителий конъюнктив
	ивы	ивы	ивы
	в стадии компенсации	в стадии субкомпенсации	в стадии декомпенсации

Взаимосвязь морфофункциональных показателей с генотипами полиморфного маркера *rs 4072037* гена *MUC1*

Показатель		Генотип	
		AG	GG
Тест Ширмера I	Rs	0,4358	0,5394
	p	0,026	0,012
Проба Норна	Rs	0,4358	0,578
	p	0,026	0,011
Импресс. цитология кон-вы	Rs	0.8313	0.5443
	p	<0.0001	0.0932

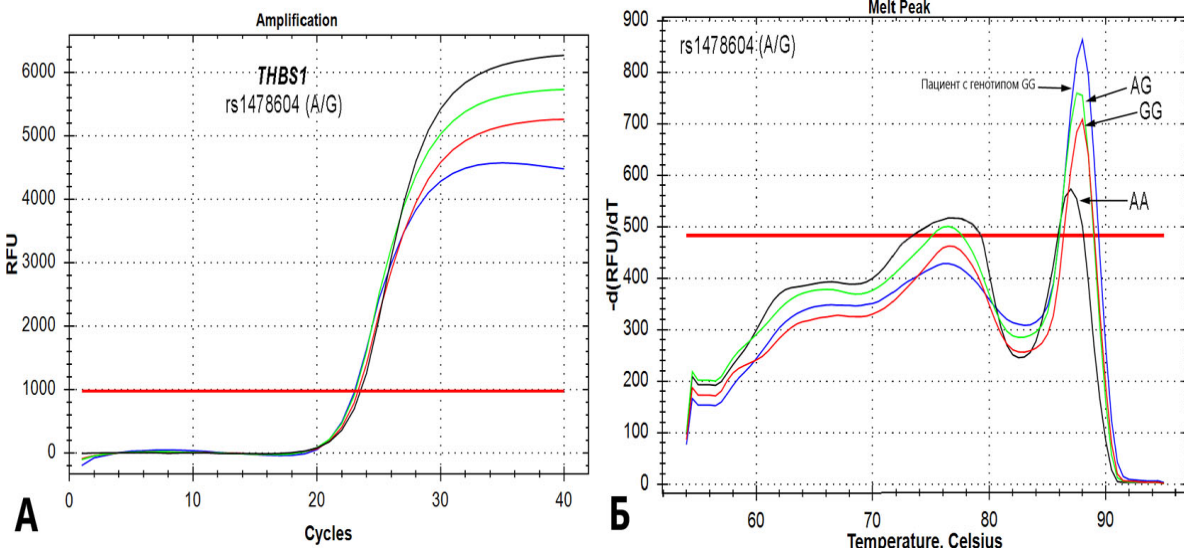
Корреляционный анализ взаимосвязи морфофункциональных показателей с распределением генотипов полиморфного маркера *rs4072037* гена *MUC1*

Rs – коэффициент Спирмена; p-статистическая достоверность

Анализ полиморфного маркера *rs1478604* гена *THBS1* у пациентов с БШ и контрольной группы

Результат анализа маркера *rs1478604* гена *THBS1* с использованием метода анализа кривых плавления ДНК. **А** – кривые накопления маркера *rs1478604* в реальном времени; **Б** – температурные кривые плавления продукта амплификации маркера *rs1478604*. **AA** – контроль нижней гомозиготы (норма); **AG** – контроль гетерозиготы; **GG** – контроль верхней гомозиготы (мутант).

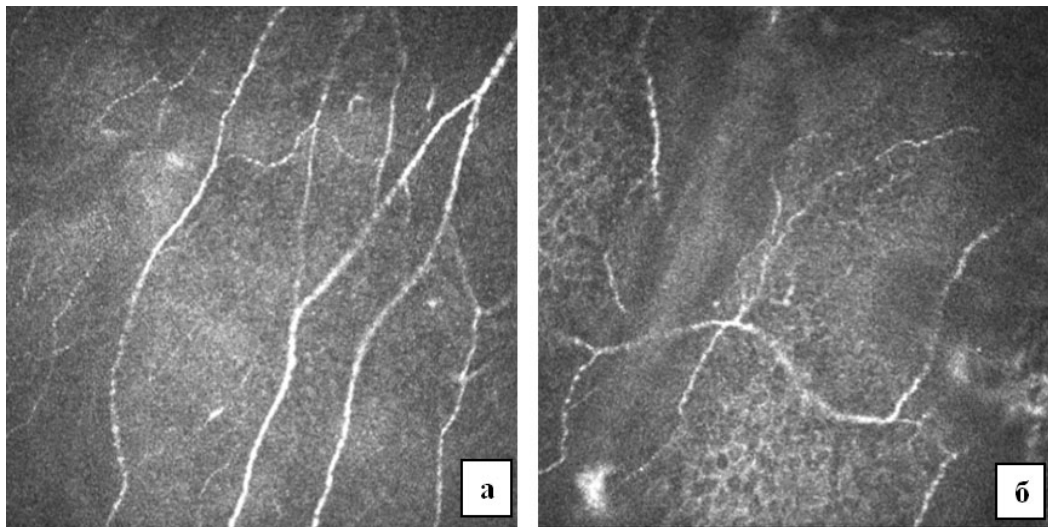
Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs1478604* гена *THBS1* у пациентов с ПСШ и группы контроля



Генотипы	Пациенты с БШ n = 75	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
					знач.	CI _{95%}
AA	0.320	0.430	13.27	0.001	0.50	0.33 – 0.78
AG	0.360*	0.470			0.50	0.42 – 0.87
GG	0.320	0.100			1.99	1.29 – 3.06

*распределение частот не соответствует равновесию Харди-Вайнберга

Взаимосвязь средних значений коэффициента анизотропии ($K_{\Delta L}$) и симметричности направленности (K_{sym}) НВР с генотипами полиморфных маркеров *rs1478604* и *rs2228262* гена *THBS1*

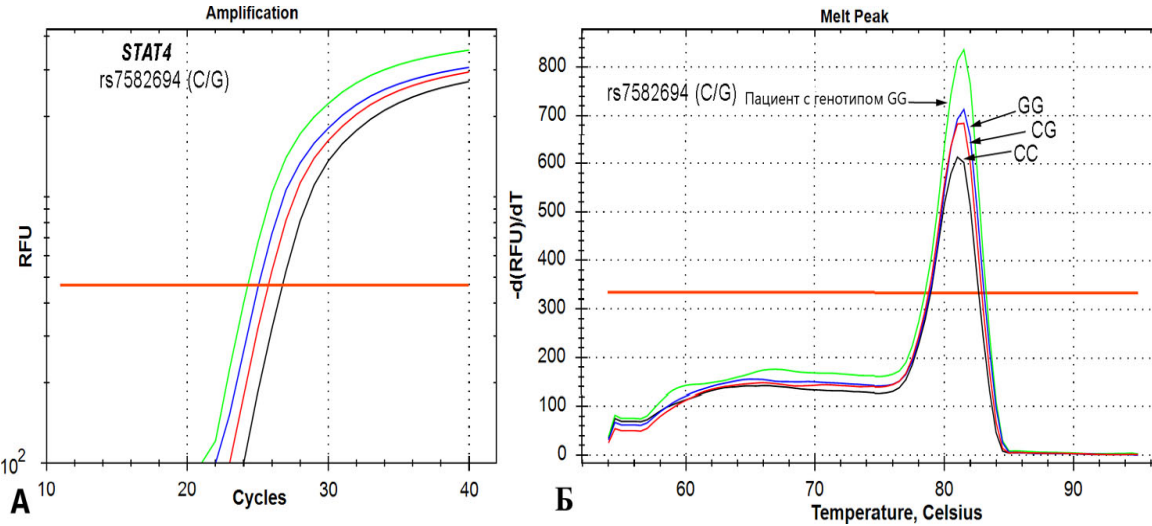


Сканограммы НРТ пациента с СКК на фоне БШ; а- НВР утолщены, структура и параллельное расположение НВР нарушено; б- НВР разнонаправлены, извиты.

Маркер	Генотипы		
	AA	GA	GG
<i>rs1478604</i>			
$K_{\Delta L}$	2.8±0.11	3.19±0.35	2.47±0.15
K_{sym}	0.94±0.11	0.93±0.17	0.88±0.09
<i>rs2228262</i>			
$K_{\Delta L}$	2.65±0,19	2.98±0.21	2.61±0.17
K_{sym}	0.94±0,08	0.91±0.07	0.86±0.1

* - данные достоверно различаются ($p < 0.05$)

Анализ полиморфного маркера *rs7582694* гена *STAT4* у пациентов с БШ и контрольной группы



Результат анализа мутации маркера *rs7582694* с использованием кривых плавления. **А** – кривые накопления полиморфного маркера *rs7582694* в реальном времени; **Б** – температурные кривые плавления продукта амплификации маркера *rs7582694*. **CC** – контроль нижней гомозиготы (норма); **CT** – контроль гетерозиготы; **GG** – контроль верхней гомозиготы (мутант).

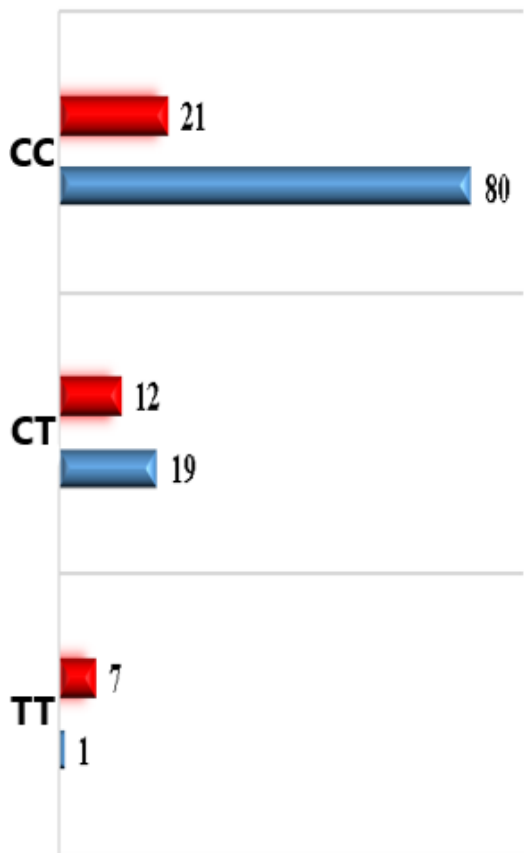
Генотипы	Пациенты с БШ (n = 75)	Контроль (n = 100)	χ^2	p	OR	
					знач.	CI _{95%}
CC	0.373	0.710	21.20	0.00002	0,31	0,19–0,50
CG	0.467	0.250			1,23	0,79–1,91
GG	0.160	0.040			3,28	2,00–5,39

Распределение частот генотипов полиморфного маркера *rs7582694* гена *STAT4* у пациентов с БШ и группы контроля.

*распределение частот не соответствует равновесию Харди-Вайнберга

Г.В. Зайцева, Т.Н. Сафонова, А.М. Бурденный, В.И. Логинов, 2021

Распределение частот генотипов полиморфных маркеров *rs2476601*, *rs33996649* гена *PTPN22* в группе пациентов с БШ и контрольной группе



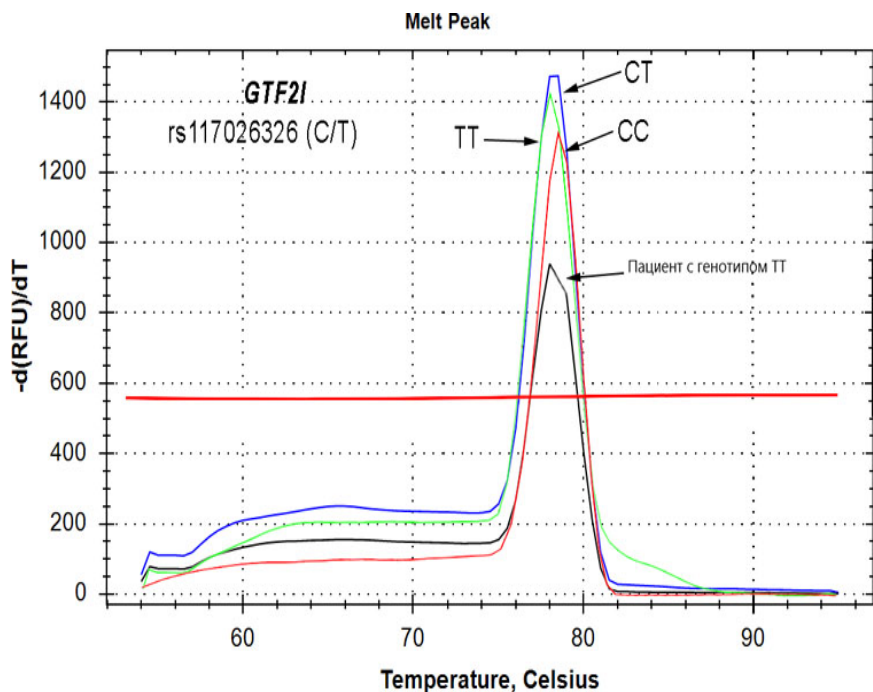
■ Случай ■ Контроль

Маркер *rs33996649* в 2-й и контрольной группе

Полиморфный маркер	Генотипы	Пациенты с БШ n = 75	Контроль n = 100	χ^2	p	OR	
						знач.	CI _{95%}
<i>rs2476601</i>	GG	0.547	0.690	10.63	0.0049	0.47	0.28–0.80
	AG	0.333	0.300			0.85	0.55–1.31
	AA	0.120	0.010			2.11	1.26–3.54
<i>rs33996649</i>	CC	0.627	0.800	10.69	0.0048	0.37	0.21–0.67
	CT	0.267*	0.190			0.96	0.62–1.47
	TT	0.106	0.010			2.69	1.50–4.84

*распределение частот не соответствует равновесию Харди-Вайнберга

Анализ полиморфного маркера *rs117026326* гена *GTF2I* у пациентов с БШ



Результат анализа мутации полиморфного *rs117026326* гена *GTF2I* с использованием кривых плавления ДНК. Температурные кривые плавления продукта амплификации полиморфного маркера *rs117026326* гена *GTF2I*; CC - контроль нижней гомозиготы (норма); CT - контроль гетерозиготы; TT - контроль верхней гомозиготы (мутант).

- Выявлена ассоциация предрасполагающего генотипа TT полиморфного маркера *rs117026326* гена *GTF2I* с риском развития СКК ($p=0.095$) и БШ ($p=0.075$) на уровне тенденции.

Диагностическая панель генетических маркеров для определения риска развития сухого кератоконъюнктивита на фоне ревматоидного артрита и болезни Шегрена.

STAT4	
rs7574865 G>T	rs7582694 G>C
GT	CC
GG	CG
TT	GG
PTPN22	
rs2476601 C>T	rs33996649 G>A
CC	AA
CT	GG
TT	AG

THBS1		
rs1478604 T>C	rs2292305 A>G	rs2228262A>G
CC	AG	AA
CT	GG	AG
TT	AA	GG
TRIM21		
rs7947461 C/T	rs915956 C/T	rs4144331 A/C
TT	TT	AA
CT	CC	AC
CC	CT	CC
MUC1		
rs4072037 A/G		
GG		
AG		
AA		

Спасибо за внимание!