

УДК 617.713

Результаты изучения генетических маркеров, ассоциированных с первичной эндотелиальной дистрофией роговицы (Фукса)

Б.Э. Малюгин¹, О.П. Антонова¹, Л.О. Скородумова², Л.И. Шарова², О.В. Селезнева², С.А. Даниленко², Е.С. Кострюкова²

¹ ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва;

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» Федерального медико-биологического агентства, Москва

РЕФЕРАТ

Цель. Провести генотипирование в российской популяции пациентов с первичной эндотелиальной дистрофией роговицы Фукса (ДФ) числа тринуклеотидных повторов СТГ18.1 и однонуклеотидных полиморфизмов rs613872 и rs17595731 у пациентов.

Материал и методы. В группу исследования были отобраны 78 пациентов с ДФ. Однонуклеотидные полиморфизмы были генотипированы с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) и секвенирования по Сэнгеру, а число тринуклеотидных повторов определялось сочетанием методов стандартной ПЦР или ПЦР с праймированием триплетов (Triplet Primed Polymerase Chain Reaction – TP-PCR) и фрагментного анализа.

Результаты. Одна маркерная аллель G rs613872 была детектирована у 66,7% пациентов, а одновременно две – у 6,4%. Генотип G/C rs17595731 встречался в нашей выборке с частотой 12,8%. Моноаллельная экспансия тринуклеотидных повторов СТГ18.1 была обнаружена у 62,8% пациентов, а биаллельная – у 3,9%. Хотя бы одна маркерная аллель была найдена у 74,4% пациентов с ДФ. Частоты распространения маркерных аллелей rs613872, rs17595731, а также СТГ18.1 находятся в границах, описанных в литературе для пациентов с ДФ в европейских и американских популяциях.

Офтальмохирургия. – 2016. – № 4. – С. 44-50.

Заключение. В настоящей работе у российских пациентов с ДФ была впервые оценена частота встречаемости маркерных аллелей в однонуклеотидных полиморфизмах rs613872 и rs17595731, а также экспансии тринуклеотидных повторов СТГ18.1. В результате исследования показано, что сочетание двух маркеров rs613872 и rs17595731 позволяет детектировать 74,4% пациентов с ДФ, причем маркер rs613872 вносит наибольший вклад в суммарное значение чувствительности теста.

Ключевые слова: первичная эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса, молекулярные маркеры, TCF4, короткие тандемные повторы, TP-PCR. ■

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

Авторы не имеют финансовых или имущественных интересов в упомянутых материале и методах.

ABSTRACT

The study of genetic markers associated with primary endothelial corneal dystrophy (Fuchs)

B.E. Malyugin¹, O.P. Antonova¹, L.O. Skorodumova², E.I. Sharova², O.V. Selezneva², S.A. Danilenko², E.S. Kostryukova²

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow;

² The Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow

Purpose. To assess the frequency of the marker alleles at single polymorphisms rs613872, rs17595731 and CTG18.1 trinucleotide repeat expansion in Russian patients with Fuchs' endothelial corneal dystrophy (FECD).

Material and methods. This study included 78 FECD patients. Single nucleotide polymorphisms were genotyped using Sanger sequencing and the number of trinucleotide repeats was determined by a combination of short tandem repeat assay and triplet repeat primed PCR assay (TP-PCR) (Triplet Primed Polymerase Chain Reaction).

Results. At least one marker allele was found 74.4% of FECD patients. One rs613872 marker allele was detected in 66.7% of FECD patients, and simultaneously two alleles – in 6.4%. The rs17595731 genotype G/C was present in 12.8% of FECD patients. Monoallelic expansion of the CTG18.1 was detected in 62.8% of FECD patients, and biallelic – in 3.9%. Hence, the distribution of rs613872, rs17595731 and CTG18.1 marker alleles in Russian FECD patients was similar to those reported for European and American FECD populations.

Conclusion. The present paper for the first time assessed the incidence of marker alleles in single nucleotide polymorphisms rs613872 and rs17595731 as well as the expansion of trinucleotide repetitions CTG18.1 in Russian FECD patients. Our study showed that the combination of the two markers rs613872 and rs17595731 allows detecting 74.4% of FECD patients, and thereat, the marker rs613872 makes the greatest contribution to the total value of the sensitivity of the test.

Key words: Fuchs' primary endothelial corneal dystrophy, molecular markers, TCF4, short tandem repeats, TP-PCR. ■

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

No author has a financial or proprietary interest in any material or method mentioned.

The Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery. – 2016. – No. 4. – P. 44-50.

Согласно современным представлениям эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса (ДФ) – это наследственное заболевание глаза, связанное со снижением плотности и функции клеток заднего эпителия (эндотелия) роговицы. При данном заболевании количество клеток эндотелия при рождении не отличается от нормы, однако вследствие постепенного прогрессирующего нарушения функционирования их гибель наступает быстрее. Заболевание манифестирует при декомпенсации клеток эндотелия, выполняющих главную роль в поддержании постоянства уровня гидратации стромы роговицы. В результате прогрессии ДФ развивается отек роговицы, снижается острота зрения вплоть до светоощущения, что приводит к значительному снижению качества жизни и инвалидизации больного. В настоящее время единственным радикальным методом является хирургическое лечение ДФ. При этом на современном этапе развития офтальмохирургии предпочтение отдается селективной послойной кератопластике с использованием методов трансплантации донорской десцеметовой мембраны вместе с расположенным на её поверхности слоем эндотелиальных клеток с или без части слоев прилежащей к ней стромы роговицы (пересадка десцеметовой мембраны и задняя автоматизированная послойная кератопластика). По данным американской ассоциации глазных банков ДФ является показанием к трансплантации роговицы в 25% всех случаев кератопластики [7].

Стоит отметить, что возраст манифестации ДФ совпадает с началом развития у пациентов возрастной катаракты, глаукомы, сенильной макулярной дегенерации. В подобных случаях при наличии сочетанной патологии нередко возникает вопрос о выборе корректной тактики лечения. Этот вопрос является ещё более актуальным в свете активного развития офтальмохирургии, в частности методов кератопластики. ДФ является генетическим заболеванием с аутосомно-доминантным типом наследования, до 50% клинических случаев имеет семейный характер [8]. В связи с этим, разработка уточняющей молекулярно-гене-

тической диагностики ДФ и предрасположенности к ней может послужить, наряду с комплексом клинико-функциональных исследований, ключевым элементом выбора тактики лечения пациента.

На данный момент известно, что редко встречающаяся ДФ раннего начала (с возрастом постановки диагноза до 50-ти лет) и ДФ позднего начала (наиболее распространенная форма, развивающаяся на шестой декаде жизни) имеют разные генетические предпосылки. При проведении анализа групп сцепленных генов в больших семьях с ранним возрастом манифестации ДФ была обнаружена связь между мутациями в гене коллагена VIII типа $\alpha 2$ (COL8A2) [4, 13, 14, 17]. При этом связь мутаций в гене COL8A2 с поздней ДФ не была подтверждена [1, 2]. Анализ сцепления генов в семьях с ДФ позднего начала позволил выявить локусы, сцепленные с данным заболеванием у отдельных семей: 13pTel-13q12.13 (FCD1), 18q21.2-q21.3 (FCD2), 5q33.1-35.2 (FCD3), 9p22.1-p24.1 (FCD4) и локусы на хромосомах 1, 7, 15 и X [1, 22, 27, 29, 30]. До сих пор для большинства локусов конкретные мутации не уточнены. Для двух семей были найдены казуальные мутации: в гене LOXHD1 с.1639C>T и в гене AGBL1 с.3082C>T [24, 25]. При поиске мутаций в генах LOXHD1 и AGBL1 на выборах спорадической ДФ позднего начала оказалось, что они очень редки – 6,7 и 1,6% соответственно. На основании вышесказанного можно предположить, что в развитии семейных случаев ДФ играют роль уникальные для каждой семьи мутации, не характерные для спорадических случаев ДФ.

Одним из направлений поиска генетических вариантов, ассоциированных со спорадической ДФ позднего начала, был анализ распространенности мутаций в генах, являющихся причиной других видов дистрофий роговицы. В их число вошли мутации в гене SLC4A11, определяющего появление врожденной

наследственной эндотелиальной дистрофии типа 2, и мутации в гене TCF8, вызывающие заднюю полиморфную дистрофию роговицы [9, 34]. Частота встречаемости мутаций в генах SLC4A11 и TCF8 среди выборки спорадической ДФ позднего начала была очень низкой – 1,3-0,26% [10, 15, 26, 27, 33]. Таким образом, мутации в генах SLC4A11 и TCF8 играют небольшую роль в общем числе мутаций, ассоциированных с ДФ.

Достижением на пути выяснения генетических причин спорадической ДФ позднего начала стали результаты первого полногеномного исследования ассоциаций (genome-wide association study – GWAS) в когорте пациентов с ДФ [3]. В группе пациентов с ДФ была зафиксирована достоверная корреляция фенотипа с регионом на хромосоме 18 в локусе q21.2. Он захватывал ген TCF4, а самую выраженную связь с ДФ имел однонуклеотидный полиморфизм rs613872. Затем ассоциация наличия маркерной аллели в полиморфизме rs613872 с ДФ была подтверждена ещё в ряде исследований, в которых участвовало в общей сложности больше тысячи человек [6, 10, 12, 18, 23, 28, 36]. При изучении китайской и индийской популяций не подтвердилась ассоциация маркерной аллели в однонуклеотидном полиморфизме rs613872 с ДФ [20, 31]. Также ассоциированы с ДФ, но в меньшей степени, другие однонуклеотидные полиморфизмы в гене TCF4: rs17595731, rs9954153 и rs2286812 [3, 10, 12]. По результатам мета-анализа 13 работ, изучавших однонуклеотидные полиморфизмы в гене TCF4, наибольшая ассоциация с риском развития ДФ была у rs613872: GG против TT: OR=10,64, 95% CI=5,28-21,41; GT против TT: OR=6,08, 95% CI=4,28-8,64 [11]. Суммируя вышесказанное, однонуклеотидные полиморфизмы в гене TCF4 имеют наиболее выраженную связь с наличием ДФ в европейской и американской популяциях, особенно rs613872.

Для корреспонденции:

Малюгин Борис Эдуардович, докт. мед. наук, профессор, зам. ген. директора по научной работе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России
E-mail: malyugin@mntk.ru

Другим важным открытием в изучении генетики ДФ стало выявление зависимости между заболеванием и экспансией тринуклеотидных повторов в интроне гена TCF4 – CTG18.1 [37]. Оказалось, что у 79% пациентов с ДФ число повторов CTG18.1 хотя бы на одной аллели превышало 50, тогда как в контрольной группе такое число встречалось только у 3% человек. Экспансия тринуклеотидных повторов оказалась более специфичным маркером ДФ, чем rs613872 (96 против 79%). В исследовании Mootha V.V. et al. у пациентов с ДФ экспансия тринуклеотидных повторов (>40) CTG18.1 с полной пенетрантностью сегрегировалась в 52% семей с ДФ [18]. Относительный риск при наличии хотя бы одной экспансированной аллели повторов CTG18.1 увеличивался в 32,3 раза (95% CI, 13,4-77,6) [18]. В самом обширном исследовании экспансии CTG18.1 у пациентов с ДФ было выяснено, что казуальными для развития заболевания является либо наличие одной экспансированной аллели с числом повторов, превышающим 103, либо наличие двух экспансированных аллелей (n>40) [32]. Таким образом, на основании высоких показателей специфичности и показанной связи с развитием ДФ экспансия тринуклеотидных повторов CTG18.1 в интроне гена TCF4 является пока самым перспективным маркером ДФ.

На данный момент известно, что экспансия тринуклеотидных повторов является причиной более чем двадцати нейромусcularных и нейродегенеративных заболеваний. Учитывая то, что клетки заднего эндотелия роговицы происходят из нервного гребня и то, что экспансия повторов CTG18.1 является наиболее специфичным маркером ДФ, можно предположить, что здесь существует причинно-следственная связь [38]. Действительно, показано, что в эндотелиальных клетках пациентов с экспансией CTG18.1 наблюдаются очаги РНК (RNA foci) в ядре [19]. Ранее очаги РНК в ядре наблюдались только при нейродегенеративных заболеваниях, вызванных экспансией тринуклеотидных повторов. Очаги РНК – это структуры, визуализируемые с помощью флюоресцентной гибридизации *in situ*; они

состоят из транскриптов с экспансированными повторами, образующими стабилизирующие шпильки, и белков, взаимодействующих с РНК [16]. Выяснено, что транскрипты поли(CUG)_n РНК при ДФ агрегируют на себе молекулы фактора сплайсинга мРНК MBNL1, что приводит к нарушению ассоциированных с ним пре-мРНК [5]. В результате полнотранскриптного секвенирования эндотелиальных клеток пациентов с ДФ и экспансированными повторами были обнаружены значительные изменения в сплайсинге по сравнению с транскриптомом эндотелиальных клеток здоровых пациентов. Таким образом, экспансия тринуклеотидных повторов CTG18.1 не просто статистически ассоциирована с ДФ, а играет непосредственную роль в патофизиологии данного заболевания.

В соответствии с вышесказанным, результаты исследования маркеров в гене TCF4, которые имеют наиболее выраженную связь с ДФ, могут послужить научной основой для разработки уточняющей диагностики пациентов группы риска по данному заболеванию. Однако к настоящему моменту у российской популяции пациентов с ДФ маркеры, ассоциированные с ДФ, не изучались, что послужило основанием к проведению данной работы.

ЦЕЛЬ

Провести генотипирование в российской популяции пациентов с ДФ числа тринуклеотидных повторов CTG18.1 и однонуклеотидных полиморфизмов rs613872 и rs17595731.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Биологические образцы пациентов с дистрофией Фукса

Клиническая часть работы выполнена на базе ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Фёдорова» Минздрава России. В когорту исследуемых отобрали пациентов, обратившихся с жалобами на снижение остроты зрения либо направленных на консультацию после оперативного лечения по поводу катаракты по

месту жительства с диагнозом артерифакии и эндотелиальной дистрофии роговицы, у которых в ходе обследования была диагностирована первичная эндотелиальная дистрофия роговицы Фукса. Из 78 пациентов было 11 мужчин и 67 женщин (соотношение полов 1:6). Средний возраст мужчин – 70±6,0 лет, средний возраст женщин – 66±12,0 лет, средний возраст исследуемой группы в целом – 67±11,0 лет. Из 78 пациентов у четырех пациентов (DFu_6, DFu_25, DFu_47, DFu_58) диагноз был поставлен в возрасте до 51 года включительно. У 14 пациентов возраст постановки диагноза находился в пределах 52-61 года включительно (DFu_5, DFu_11, DFu_27, DFu_34, DFu_45, DFu_48, DFu_52, DFu_55, DFu_56, DFu_59, DFu_60, DFu_61, DFu_73, DFu_74). После получения информированного согласия, у пациентов собирали образцы венозной крови в объеме 4-6 мл. Образцы хранили при температуре -20°C до момента исследования. Максимальный срок хранения не превышал 24 мес.

Выделение ДНК из образцов крови

ДНК была выделена из размороженных образцов крови (400 мкл) с помощью набора Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., США) согласно протоколу производителя.

Генотипирование

Праймеры к интересующим участкам ДНК были подобраны и проверены на специфичность с помощью программ «Premier Primer» («Premier Biosoft», США) и «Primer-BLAST» («NCBI», США). Последовательности праймеров CTG-P3, CTG-P4 взяты из соответствующей публикации (табл. 1) [18].

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов rs613872 и rs17595731 проводилось с помощью секвенирования по Сэнгеру продуктов ПЦР. Для проведения ПЦР использовался стандартный набор для амплификации ДНК «Gene Pak® PCR MasterMix Core» («IsoGene Lab. Ltd.», Россия). Объем реакции 20 мкл, количество ДНК в реакцию – 30 нг, конечная концентрация праймеров 0,3 мкМ.

Реакцию секвенирования проводили с использованием набо-

ра BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Thermo Fisher Scientific», США) по протоколу производителя. Секвенирование проводили на капиллярных секвенаторах ABI Prism 3730XL («Applied Biosystems», США). Результаты секвенирования анализировали в Unipro UGENE [21].

Для определения числа тринуклеотидных повторов вначале для всех образцов ДНК выполняли ПЦР и фрагментный анализ. Условия ПЦР были аналогичны условиям ПЦР для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов, праймер CTG-2F был мечен флуоресцентным красителем FAM. В тех случаях, когда детектировалась только одна немаркерная аллель, проводили ПЦР с праймированием триплетов (Triplet Primed Polymerase Chain Reaction – TP-PCR) и последующим разделением продуктов амплификации. Для постановки TP-PCR использовали набор «Encyclo Plus PCR Kit» («Евроген», Россия). Объем реакции 20 мкл, количество ДНК в реакцию – 50 нг. Конечная концентрация праймеров в TP-PCR: CTG-F2 – 0,3 мкМ, CTG-P4 – 0,3 мкМ, CTG-P3 – 0,01 мкМ. Условия TP-PCR: предварительная денатурация при 94° С в течение 3 минут; далее 44 цикла денатурации при 94° С в течение 20 с, отжига – при 61° С в течение 30 с, элонгации – при 72° С в течение 2 минут; финальная элонгация – при 72° С в течение 10 минут (табл. 1).

Фрагментный анализ был выполнен компанией «Синтол» (Россия) на приборе 3730XL DNA Analyzer

(«Applied Biosystems, Inc.», США). Для анализа результатов использовали программу «GeneMarker» («SoftGenetics, LLC.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В российской выборке из 78 пациентов с ДФ было изучено распространение маркерных аллелей в гене TCF4: экспансии тринуклеотидных повторов CTG18.1 и однонуклеотидных полиморфизмов rs613872 – с.451+42209С>А и rs17595731 – с.610+20798С>G. Согласно литературным данным выбранные маркеры обладают наиболее выраженной ассоциацией с ДФ.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов rs613872 и rs17595731

Для генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов rs613872 и rs17595731 осуществляли амплификацию с ДНК пациентов с ДФ и праймерами TCF4-F/R1 и TCF4-F/R2 соответственно. Продукты амплификации были отсекуены, как описано в разделе «Материал и методы». В результате анализа хроматограмм одна маркерная аллель rs613872 (генотип G/T) была детектирована у 52 пациентов и две маркерные аллели (генотип G/G) – у 5 пациентов из 78 генотипированных. Таким образом, частота встречаемости гетерозигот и гомозигот по маркерной аллели полиморфизма rs613872 в исследуемой когорте составила 66,7 и 6,4% соответствен-

но. Хотя бы одна маркерная аллель полиморфизма rs17595731 (генотип C/G) была детектирована у 10 пациентов из 78, пациентов с двумя маркерными аллелями полиморфизма rs17595731 (генотип G/G) обнаружено не было. Таким образом, частота встречаемости гетерозигот по маркерной аллели полиморфизма rs17595731 в исследуемой выборке составила 12,8%. Приведенные значения обобщены на табл. 2.

Генотипирование тринуклеотидных повторов CTG18.1

Для определения числа тринуклеотидных повторов использовали сочетание методов стандартной ПЦР или TP-PCR и фрагментного анализа. Использование метода TP-PCR необходимо для подтверждения наличия двух аллелей одинаковой длины и детекции сильно экспансированных аллелей. Этот метод был впервые описан Warner et al. [35]. Метод TP-PCR позволяет обойти ингибирование амплификации длинного продукта экспансированной аллели, происходящее при проведении стандартной ПЦР. Для постановки TP-PCR один из праймеров (в данной работе CTG-F2) должен быть комплементарным участку ДНК вне тринуклеотидных повторов, а второй праймер (в данной работе CTG-P4) состоит из нуклеотидных остатков, комплементарных повторам, и последовательности, не гомологичной человеку. Частично комплементарный повторам праймер содержится в очень небольшой концентрации и быстро истощается. С помощью третьего праймера (в данной ра-

Таблица 1

Последовательности праймеров, использованных для генотипирования пациентов с ДФ

Название маркера	Название праймера	Последовательность праймера 5'>3'	Длина ампликона, п.н.
CTG18.1	CTG-F2	TGAGTTTGGTGAAGATGCATT	min 236
	CTG-R2	AGTGCAACAAGCAGAAAGGG	
	CTG-P3	TACGCATCCCAGTTTGAGACG	min 126
	CTG-P4	TACGCATCCCAGTTTGAGACGCGAGCAGCAGCAG	
rs613872	TCF4-F1	AGCCAAGGCAGTGTATTATCTC	442
	TCF4-R1	CACCCATTTGTCTGTTGATGAT	
rs17595731	TCF4-F2	GGACAGATGTCAGACACAGAC	430
	TCF4-R2	TCTTACACAGCATAACTTTGGG	

Таблица 2

Результаты генотипирования маркеров дистрофии Фукса

Название маркера	CTG18.1			rs613872			rs17595731		
	Биаллельная экспансия	Моноаллельная экспансия	Нет экспансии	G/G	G/T	T/T	G/G	G/C	C/C
Количество пациентов с данным генотипом	3	49	26	5	52	21	0	10	68
Доля пациентов, %	3,9	62,8	33,3	6,4	66,7	26,9	0	12,8	82,2

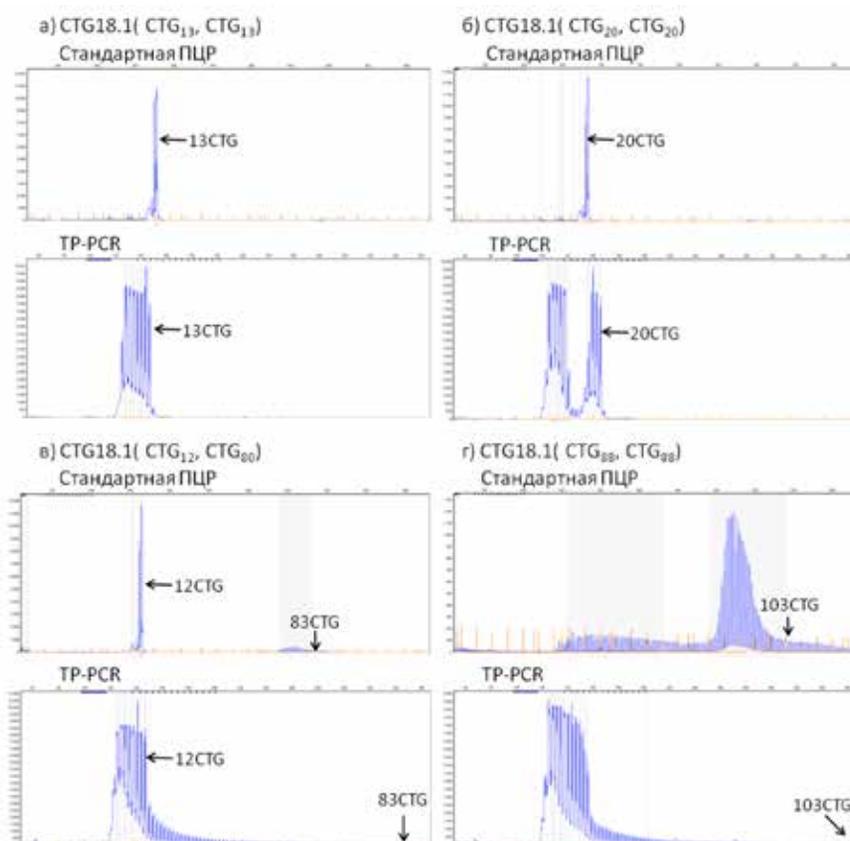


Рис. 1. Примеры электрофореграмм фрагментного анализа продуктов стандартной ПЦР и продуктов TP-PCR с праймерами к тринуклеотидным повторам CTG18.1, где: а) и б) образцы с двумя неэкспансированными аллелями одинаковой длины, в) образец с одной неэкспансированной аллелью и одной экспансированной аллелью, г) образец с двумя экспансированными аллелями

боте CTG-P3), содержащего только не гомологичную человеку последовательность, нарабатываются до визуализируемого количества продукты амплификации повторов, полученные с праймеров CTG-F2 и CTG-P4. В том случае, когда в ДНК присутствуют две аллели одинаковой длины, и из-за этого на фрагментном анализе виден только один пик, при анализе продуктов TP-PCR будет детектироваться только одна или две распо-

ложенных рядом группы пиков приблизительно одинаковой интенсивности (рис. 1а и б). Если образец ДНК содержит одну неэкспансированную аллель и одну экспансированную аллель, то, кроме группы пиков одинаковой интенсивности, соответствующих неэкспансированной аллели, в диапазоне больших длин будет виден «шлейф» пиков с уменьшающейся интенсивностью (рис. 1в). Если две аллели экспансированы, то интенсивность

пиков будет постепенно уменьшаться и переходить в «шлейф» (рис. 1г). В некоторых случаях разница между результатами образцов с одной или двумя экспансированными аллелями была малозаметна. В таких ситуациях учитывались одновременно результаты фрагментного анализа продуктов и стандартной ПЦР и TP-PCR.

Таким образом, для всех образцов ДНК пациентов с ДФ провели амплификацию тринуклеотидных повторов с помощью стандартной ПЦР и праймеров CTG-F/R2. Для тех образцов, в которых по результатам фрагментного анализа продуктов стандартной ПЦР требовалось подтверждение наличия двух аллелей одинаковой длины или детекция экспансированной аллели, проводили TP-PCR. Доля пациентов с числом тринуклеотидных повторов CTG18.1 больше 40 (экспансия) в одной аллели составила 62,8% (49 из 78) (табл. 2). У трех пациентов (3,9%) обе аллели были экспансированы (Dfu_25, Dfu_23 и Dfu_78).

Расчет чувствительности проанализированных маркеров дистрофии Фукса

По результатам генотипирования была рассчитана чувствительность отдельных маркеров и всех возможных их комбинаций в пересчете на число генотипированных пациентов (табл. 3). Наличием сигнала маркера считалась детекция у пациента хотя бы одной маркерной (экспансированной) аллели. Ни один из маркеров по отдельности не обеспечивал 100% чувствительность, наибольшая индивидуальная чувствительность у маркера rs613872, наименьшая – у rs17595731. Оказалось, что наибольший показатель чувствительности имеет сочетание двух маркеров – rs613872 и rs17595731 – 74,4%.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые была исследована частота встречаемости экспансии тринуклеотидных повторов CTG18.1 и маркерных аллелей в однонуклеотидных полиморфизмах rs613872 и rs17595731 в российской популяции пациентов с ДФ. Для 74,4% пациентов с ДФ была найдена хотя бы одна маркерная аллель одного из трех генетических вариантов.

Наличие хотя бы одной маркерной аллели G rs613872 было выявлено у 73,1% пациентов, а двух – у 6,4%. Согласно результатам исследований rs613872 в европейской и американской популяциях частота встречаемости хотя бы одной маркерной аллели в расчете на число пациентов с ДФ составляла от 69,3 до 80,4%, а в двух – от 9,3 до 14,5% [3, 12, 18, 28]. Таким образом, маркерная аллель A rs613872 среди российских пациентов с ДФ распространена с частотой, сопоставимой с таковой в европейских и американских популяциях.

В координате rs17595731 в исследованной когорте пациентов маркерная аллель G встречалась только в гетерозиготном состоянии, тогда как в литературе описаны гомозиготы по данной аллели, но частота их встречаемости очень низкая – 0,7% [3]. Скорее всего, генотип G/G не был детектирован в нашей работе из-за размера выборки. Частота встречаемости генотипа G/C rs17595731 в нашей выборке была сопоставима (12,8%) с описанной в литературе – 13-20,8% [3, 10].

Определение числа тринуклеотидных повторов было выполнено с помощью сочетания методов стандартной ПЦР, TP-PCR и фрагментного анализа. В исследованной когорте частота встречаемости генотипов хотя бы с одной экспансированной аллелью была равна 66,7%, что находится в границах частот, описанных в литературе для европейской и американской выборки пациентов с ДФ: от 65,8 до 73,3% [18, 32, 36].

Благодаря тому, что одновременно у каждого пациента были генотипированы все три маркера, появилась возможность оценить особенности их сочетания. Было отмечено, что экспансия тринуклеотидных повторов CTG18.1 всегда сочеталась с

Таблица 3

Расчет чувствительности маркеров ДФ			
Название маркера	Сигналы	Сигнала нет	Чувствительность, %
rs613872	57	21	73,1
rs17595731	10	68	12,8
CTG18.1	52	26	66,7
rs613872+ rs17595731	58	20	74,4
rs613872+CTG18.1	57	21	73,1
CTG18.1+ rs17595731	54	24	69,2
rs613872+ rs17595731+CTG18.1	58	21	74,4

наличием хотя бы одной маркерной аллели полиморфизма rs613872. Во всех случаях биаллельной экспансии CTG18.1 была детектирована маркерная гомозигота rs613872. Маркерная аллель полиморфизма rs17595731 чаще всего встречалась у пациентов, имеющих гетерозиготу по маркерной аллели rs613872, кроме случая пациента Dfu_50, у которого аллели rs613872 не маркерные, а аллель rs17595731 – маркерная.

На данный момент в литературе есть только одно исследование, в котором были бы одновременно изучены все три маркера, но из приведенных данных невозможно восстановить информацию о сочетании генотипов маркеров у отдельных пациентов [36]. Известно две работы, в которых у пациентов были одновременно исследованы среди прочих маркеров полиморфизмы rs613872 и CTG18.1 и приведены данные о сочетании маркеров в гаплотипах [18, 20]. По ним невозможно подтвердить или опровергнуть выявленное в нашем исследовании наблюдение о сочетании двух экспансированных аллелей CTG18.1 с маркерной гомозиготой по rs613872, но они свидетельствуют в пользу преобладания гаплотипа «экспансированная аллель CTG18.1 и маркерная аллель rs613872», другие сочетания в гаплотипах встречаются намного реже.

Ни в одной из известных к настоящему времени работ не была оценена чувствительность сочетания маркеров. В нашем исследовании было

показано, что наибольшую чувствительность (74,4%) обеспечивает комбинация двух маркеров rs613872 и rs17595731. Маркер rs613872 вносит наибольший вклад в суммарное значение чувствительности, но, согласно литературным данным, он обладает специфичностью в диапазоне 65,9-79% [3, 12, 18, 28]. А маркер CTG18.1 имеет меньшую чувствительность, чем rs613872, но демонстрирует очень высокую специфичность: 93-98,4% [18, 32, 36]. После генотипирования контрольной группы пациентов, которое планируется выполнить в ближайшем будущем, можно будет оценить специфичность каждого из маркеров CTG18.1, rs613872 и rs17595731 и сочетание, которое будет обладать наибольшей диагностической ценностью для российской популяции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые пациенты с ДФ российской популяции были генотипированы по маркерам ДФ, расположенным в гене TCF4: тринуклеотидным повторам CTG18.1, однонуклеотидным полиморфизмам rs613872 и rs17595731. У 74,4% пациентов с ДФ присутствовала хотя бы одна маркерная аллель одного из трех маркеров, что является высоким показателем для диагностических маркеров полигенных заболеваний. Маркерные аллели rs613872, rs17595731 и CTG18.1 детектировались с частотой, сопоставимой с опубликованными данными

ми. Было показано, что чувствительность, равную 74,4%, обеспечивает сочетание двух маркеров – rs613872 и rs17595731. Результаты данного исследования являются научной основой к созданию уточняющей молекулярно-генетической диагностики ДФ у пациентов группы риска.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Afsbari N.A., Li Y.J., Pericak-Vance M.A. et al.* Genome-wide linkage scan in Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 1093-1097.
2. *Aldave A.J., Raymer S.A., Salem A.K. et al.* No pathogenic mutations identified in the COL8A1 and COL8A2 genes in familial Fuchs corneal dystrophy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 9. – P. 3787-3790.
3. *Baratz K.H., Tosakulwong N., Ryu E. et al.* E2-2 protein and Fuchs's corneal dystrophy // *N. Engl. J. Med.* – 2010. – Vol. 363, № 11. – P. 1016-1024.
4. *Biswas S., Munier F.L., Yardley J. et al.* Missense mutations in COL8A2, the gene encoding the $\alpha 2$ chain of type VIII collagen, cause two forms of corneal endothelial dystrophy // *Human molecular genetics.* – 2001. – Vol. 10, № 21. – P. 2415-2423.
5. *Du J., Aleff R.A., Soragni E. et al.* RNA toxicity and missplicing in the common eye disease fuchs endothelial corneal dystrophy // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, № 10. – P. 5979-5990.
6. *Eghrari A.O., McGlumphy E.J., Iliff B.W. et al.* Prevalence and severity of Fuchs corneal dystrophy in Tangier Island // *Am. J. Ophthalmol.* – 2012. – Vol. 153, № 6. – P. 1067-1072.
7. *Kang P.C., Klintworth G.K., Kim T. et al.* Trends in the indications for penetrating keratoplasty, 1980-2001 // *Cornea.* – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 801-803.
8. *Krachmer J.H., Purcell Jr. J.J., Young C.W., Bucher K.D.* Corneal endothelial dystrophy: a study of 64 families // *Arch. Ophthalmol.* – 1978. – Vol. 96, № 11. – P. 2036-2039.
9. *Krafcbak C.M., Pawar H.M., Sayoko E. et al.* Mutations in TCF8 cause posterior polymorphous corneal dystrophy and ectopic expression of COL4A3 by corneal endothelial cells // *Am. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 77, № 5. – P. 694-708.
10. *Kuot A., Hewitt A.W., Griggs K. et al.* Association of TCF4 and CLU polymorphisms with Fuchs' endothelial dystrophy and implication of CLU and TGFBI proteins in the disease process // *Europ. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 20, № 6. – P. 632-638.
11. *Li D., Peng X.Y., Sun H.Y.* Association of TCF4 polymorphisms and fuchs' endothelial dystrophy: a meta-analysis // *BMC Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 1.
12. *Li Y.J., Minear M.A., Rimmler J. et al.* Replication of TCF4 through association and linkage studies in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. e18044.
13. *Liskova P., Prescott Q., Bhattacharya S.S., Tift S.J.* British family with early-onset Fuchs' endothelial corneal dystrophy associated with p.L450W mutation in the COL8A2 gene // *Br. J. Ophthalmol.* – 2007. – Vol. 91, № 12. – P. 1717-1718.
14. *Magovern M., Beauchamp G.R., McTigue J.W. et al.* Inheritance of Fuchs' combined dystrophy // *Ophthalmol.* – 1979. – Vol. 86, № 10. – P. 1897-1920.
15. *Mehta J.S., Vitbana E.N., Tan D.T.H. et al.* Analysis of the posterior polymorphous corneal dystrophy 3 gene, TCF8, in late-onset Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2008. – Vol. 49, № 1. – P. 184-188.
16. *Mohan A., Goodwin M., Swanson M.S.* RNA-protein interactions in unstable microsatellite diseases // *Brain Res.* – 2014. – Vol. 1584. – P. 3-14.
17. *Mok J.W., Kim H.S., Joo C.K.* Q455V mutation in COL8A2 is associated with Fuchs' corneal dystrophy in Korean patients // *Eye.* – 2009. – Vol. 23, № 4. – P. 895-903.
18. *Mootha V.V., Gong X., Ku H.C., Xing C.* Association and Familial Segregation of CTG18. 1 Trinucleotide Repeat Expansion of TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy TCF4 Gene in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55, № 1. – P. 33-42.
19. *Mootha V.V., Hussain I., Cunnusamy K. et al.* TCF4 Triplet Repeat Expansion and Nuclear RNA Foci in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy Toxin RNA in Fuchs' Dystrophy // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56, № 3. – P. 2003-2011.
20. *Nanda G.G., Padhy B., Samal S. et al.* Genetic Association of TCF4 Intronic Polymorphisms, CTG18. 1 and rs17089887, With Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy in an Indian Population Genetic Association of TCF4 With FECD // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55, № 11. – P. 7674-7680.
21. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol. 28, № 8. – P. 1166-1167.
22. *Riazuddin S.A., Eghrari A.O., Al-Saif A. et al.* Linkage of a mild late-onset phenotype of Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 5q33. 1-q35. 2 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – Vol. 50, № 12. – P. 5667-5671.
23. *Riazuddin S.A., McGlumphy E.J., Yeo W.S. et al.* Replication of the TCF4 intronic variant in late-onset Fuchs corneal dystrophy and evidence of independence from the FCD2 locus // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 5. – P. 2825-2829.
24. *Riazuddin S.A., Parker D.S., McGlumphy E.J. et al.* Mutations in LOXHD1, a recessive-deafness locus, cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy // *Am. J. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 90, № 3. – P. 533-539.
25. *Riazuddin S.A., Vasanth S., Katsanis N., Gottsch J.D.* Mutations in AGBL1 cause dominant late-onset Fuchs corneal dystrophy and alter protein-protein interaction with TCF4 // *Am. J. Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 93, № 4. – P. 758-764.
26. *Riazuddin S.A., Vitbana E.N., Seet L.-F. et al.* Missense mutations in the sodium borate cotransporter SLC4A11 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy // *Human mutation.* – 2010. – Vol. 31, № 11. – P. 1261-1268.
27. *Riazuddin S.A., Zaghloul N.A., Al-Saif A. et al.* Missense mutations in TCF8 cause late-onset Fuchs corneal dystrophy and interact with FCD4 on chromosome 9p // *Am. J. Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 86, № 1. – P. 45-53.
28. *Stamler J.F., Roos B.R., Wagoner M.D. et al.* Confirmation of the association between the TCF4 risk allele and Fuchs endothelial corneal dystrophy in patients from the Midwestern United States // *Ophthalmic Genet.* – 2013. – Vol. 34, № 1-2. – P. 32-34.
29. *Sundin O.H., Broman K.W., Chang H.H. et al.* A common locus for late-onset Fuchs corneal dystrophy maps to 18q21. 2-q21. 32 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 9. – P. 3919-3926.
30. *Sundin O.H., Jun A.S., Broman K.W. et al.* Linkage of late-onset Fuchs corneal dystrophy to a novel locus at 13pTel-13q12. 13 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2006. – Vol. 47, № 1. – P. 140-145.
31. *Thalamutbu A., Kbor C.C., Venkataraman D. et al.* Association of TCF4 gene polymorphisms with Fuchs' corneal dystrophy in the Chinese // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2011. – Vol. 52, № 8. – P. 5573-5578.
32. *Vasanth S., Eghrari A.O., Gapsis B.C. et al.* Expansion of CTG18. 1 Trinucleotide Repeat in TCF4 Is a Potent Driver of Fuchs' Corneal Dystrophy Expansion of CTG18. 1 in TCF4 Is a Driver of FCD // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2015. – Vol. 56, № 8. – P. 4531-4536.
33. *Vitbana E.N., Morgan P.E., Ramprasad V. et al.* SLC4A11 mutations in Fuchs endothelial corneal dystrophy // *Hum. Mol. Genet.* – 2008. – Vol. 17, № 5. – P. 656-666.
34. *Vitbana E.N., Morgan P., Sundaresan P. et al.* Mutations in sodium-borate cotransporter SLC4A11 cause recessive congenital hereditary endothelial dystrophy (CHED2) // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38, № 7. – P. 755-757.
35. *Warner J.P., Barron L.H., Goudie D. et al.* A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR // *J. Med. Genet.* – 1996. – Vol. 33, № 12. – P. 1022-1026.
36. *Wieben E.D., Aleff R.A., Eckloff B.W. et al.* Comprehensive Assessment of Genetic Variants Within TCF4 in Fuchs' Endothelial Corneal Dystrophy Assessment of TCF4 Variants in FECD // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2014. – Vol. 55, № 9. – P. 6101-6107.
37. *Wieben E.D., Aleff R.A., Tosakulwong N. et al.* A common trinucleotide repeat expansion within the transcription factor 4 (TCF4, E2-2) gene predicts Fuchs corneal dystrophy // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 11. – P. e49083.
38. *Zhu A.Y., Eberhart C.G., Jun A.S.* Fuchs endothelial corneal dystrophy: a neurodegenerative disorder? // *JAMA Ophthalmol.* – 2014. – Vol. 132, № 4. – P. 377-378.

Поступила 25.10.2016