

НАО «Медицинский университет Астана»

УДК 616.72-002.77:579.61:616-078

На правах рукописи

ИСИЛЬБАЕВА АРГУЛЬ АСЕТОВНА

**Клинические особенности течения и состояние микробиоценоза
у пациенток с ревматоидным артритом**

8D10102 – Медицина

Диссертация на соискание степени
доктора философии PhD

Научный консультант
доктор медицинских наук,
профессор
Б.А. Айнабекова

Научный консультант
доктор медицинских наук
профессор
А.Р. Кушугулова

Зарубежный консультант
доктор медицинских наук,
Y.E. Zueva
(Ashkelon: Ariel University,
medical faculty, Israel)

Республика Казахстан
Астана 2022

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	6
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	10
ВВЕДЕНИЕ	12
1 КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА У ПАЦИЕНТОК С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)	17
1.1 Распространенность ревматоидного артрита	17
1.2 Экзогенные факторы, способствующие развитию ревматоидного артрита.....	18
1.3 Особенности дебюта и клинические характеристики ревматоидного артрита	20
1.4 Генетическая предрасположенность к ревматоидному артриту.....	23
1.5 Особенности микробиоценоза при ревматоидном артрите.....	28
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1 Объекты исследования.....	34
2.2 Эпидемиологический анализ.....	35
2.3 Методы исследования.....	35
2.4 Статистические методы обработки данных исследования.....	40
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
3.1 Эпидемиологические данные ревматоидного артрита в Казахстане.....	43
3.2 Изучение особенностей клинического течения ревматоидного артрита	47
3.2.1 Клинико-anamнестические характеристики исследуемых женщин в зависимости от РФ-статуса.....	50
3.2.2 Клинико-anamнестические характеристики исследуемых женщин в зависимости от АЦЦП статуса.....	61
3.2.3 Анализ клинико-лабораторных данных исследуемых групп.....	72
3.2.4 Анализ результатов опросника FFQ.....	74
3.2.5 Клинические случаи пациенток РА с различными формами заболевания.....	77
3.3 Изучение генетических особенностей ревматоидного артрита	86
3.4 Изучение микробиоценоза ротовой полости при ревматоидном артрите	112
3.5 Изучение микробиоценоза кишечника при ревматоидном артрите.....	118
3.6 Состояние микробиоценоза ротовой полости и кишечника на фоне терапии ревматоидного артрита.....	133
3.6.1 Изучение микробиоценоза ротовой полости на фоне терапии ревматоидного артрита.....	133
3.6.2 Изучение микробиоценоза кишечника на фоне терапии	

ревматоидного артрита.....	138
3.7 Прогнозирование клинического течения у исследованных больных ревматоидным артритом.....	146
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	149
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	152
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Авторские свидетельства	173
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Акты внедрения.....	177
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Выписка из протокола заседания этического комитета Назарбаев Университет.....	179
ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Заключение Этической комиссии НАО МУА.....	180
ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Этапы выделения ДНК из образцов крови.....	181
ПРИЛОЖЕНИЕ Е – RT-PCR с использованием технологии TaqMan.....	183
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж – Этапы выделения ДНК из образцов слюны и кала	184
ПРИЛОЖЕНИЕ И – Подготовка ДНК-ампликонов с использованием набора Nextflex 16S.....	185

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

Этические принципы проведения исследований в медицине с участием человека: Хельсинская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации (ВМА): утв. на 18-й Генеральной Ассамблее ВМА (06.1964 г., Хельсинки, Финляндия; крайние изменения внесены 10.2013 г. Форталеза, Бразилия на 64-й Генеральной Ассамблее ВМА

ГОСТ 7.1-2003 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.12-93 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.32-2017 (Межгосударственный стандарт). Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.54-88. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования.

Конституция Республики Казахстан: принята 30 августа 1995 года (с изменениями и дополнениями по состоянию на 10.03.2017 г.).

Закон Республики Казахстан. Об охране здоровья граждан: принят 7 июля 2006 года.

Указ Президента Республики Казахстан. Государственная программа реформирования и развития здравоохранения Республики Казахстан на 2005-2010 годы: утв. 13 сентября 2004, №1438.

Указ Президента Республики Казахстан. Государственная программа развития образования в Республике Казахстан на 2005-2010 годы: утв. 11 октября 2004 года, №1459.

Президент Республики Казахстан Н.А. Назарбаев. Через кризис к обновлению и развитию: послание народу Казахстана от 6 марта 2009 года.

Президент Республики Казахстан Н.А. Назарбаев. Построим будущее вместе!: послание народу Казахстана от 28 января 2011 год.

Закон Республики Казахстан. Об образовании: принят 7 июня 1999 года, №389-І.

Кодекс Республики Казахстан. О здоровье народа и системы здравоохранения: принят 18 сентября 2009 года, №193-ІV (с изменениями и дополнениями по состоянию на 28 декабря 2018 г.).

Гражданский кодекс Республики Казахстан. Общая часть: принят 27 декабря 1994 года (с изменениями и дополнениями на 19 января 2011 года).

Закон Республики Казахстан. О системе здравоохранения: принят 4 июня 2003 года.

Закон Республики Казахстан. Об охране здоровья граждан: принят 7 июля 2006 года.

Постановление Правительства Республики Казахстан. Об утверждении Концепции реформирования медицинского и фармацевтического образования Республики Казахстан: утв. 24 апреля 2006 года, №317.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. Об утверждении Номенклатуры медицинских и фармацевтических специальностей: утв. 12 февраля 2007 года, №97.

Стратегический план министерства здравоохранения Республики Казахстан на 2009-2011 годы: утв. постановлением Правительства Республики Казахстан от 23 декабря 2008 года, №1213.

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан. Об утверждении Правил оказания специализированной и высокоспециализированной медицинской помощи: утв. 20 декабря 2010 года, №986.

Руководство по проведению добросовестных клинических исследований (ICH E6. Good Clinical Practice Guideline for Good Clinical Practice draft 9, step 2 27/04/96).

Конвенция о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины: конвенция о правах человека и биомедицине (ETS N 164.4.04.97).

Министерство здравоохранения и социального развития Республики Казахстан. Клинический протокол диагностики и лечения. Ревматоидный артрит: утв. 29 сентября 2016 года, №12.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

АЦЦП – антитела к циклическому цитруллинсодержащему пептиду, IgG – это гетерогенная группа IgG-аутоантител, которые распознают антигенные детерминанты филагтрина и других белков, содержащих атипичную аминокислоту цитруллин.

АЦЦП-негативный – отсутствие антител к циклическому цитруллинированному пептиду.

АЦЦП-позитивный – наличие антител к циклическому цитруллинированному пептиду.

ДНК-ампликон – часть ДНК, то есть источник и/или продукт событий амплификации или репликации.

Единичные нуклеотидные полиморфизмы (англ. Single Nucleotide Polymorphism, SNP, произносится как снип) – отличия последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками гомологичных хромосом.

Микробиоценоз (микробное сообщество, ассоциация, микробиом) – совокупность популяций разных видов микроорганизмов, обитающих в определенном биотопе.

Наследование – передача генетической информации (генетических признаков) от одного поколения организмов к другому. В основе наследования лежат процессы удвоения, объединения и распределения генетического материала, поэтому закономерности наследования у разных организмов зависят от особенностей этих процессов.

Поздняя стадия РА – длительность болезни 2 года и более + выраженная деструкция мелких (III-IV рентгенологическая стадия) и крупных суставов, наличие осложнений.

Полимеразно-цепная реакция – метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале (пробе).

Полимеразно-цепная реакция в реальном времени (или количественная ПЦР, англ. Real-time PCR, qPCR, qRT-PCR) – метод, основанный на методе полимеразной цепной реакции, используется для одновременной амплификации и измерения количества данной молекулы ДНК. Метод ПЦР в реальном времени включает в себя одновременно детекцию и количественное определение (измерение непосредственно количества копий, либо измерение копий относительно внесённой ДНК или дополнительных калибровочных генов) специфической последовательности ДНК в образце.

Равновесие Харди-Вайнберга – положение популяционной генетики, гласящее, что в популяции бесконечно большого размера, в которой не

действует естественный отбор, не идет мутационный процесс, отсутствует обмен особями с другими популяциями, не происходит дрейф генов, все скрещивания случайны — частоты генотипов по какому-либо гену (в случае если в популяции есть два аллеля этого гена) будут поддерживаться постоянными из поколения в поколение и соответствовать уравнению: $p^2+2pq+q^2=1$.

Развернутая стадия РА – длительность болезни более 1 года при наличии типичной симптоматики.

Ревматоидный фактор – аутоантитела, реагирующие в качестве аутоантигена с собственными иммуноглобулинами G, подвергшимися изменениям под влиянием какого-либо агента. Синтезируются плазматическими клетками синовиальной оболочки. Из суставов попадают в кровь, где создают иммунные комплексы, повреждающие стенки сосудов и синовиальную оболочку.

РФ-позитивный – присутствие ревматоидного фактора.

РФ-негативный – отсутствие ревматоидного фактора.

Секвенирование – процесс определения последовательности нуклеотидных оснований в фрагменте ДНК.

Энтеротип – это устойчивые кластеры на основе микробного состава в образцах из кишечника человека, которые определяются преобладанием тех или иных ключевых родов бактерий.

CD28 – мембранный белок, экспрессированный на Т-лимфоцитах, участвует в ко-стимуляции необходимой для активации Т-клеток. Продукт гена человека CD28.

CD40 – входит в многочисленное семейство факторов некроза опухоли (TNF). CD40L играет роль костимулирующей молекулы и индуцирует активацию антигенпредставляющих клеток в процессе стимуляции Т-клеточного рецептора молекулами главного комплекса гистосовместимости, расположенными на антигенпредставляющих клетках.

Codominant – кодоминантная модель, отражающая вариант сравнения генотипов: отдельные сравнения гетерозиготного и вариантного гомозиготного с референтным гомозиготным.

COG6 – ген, кодирующий субъединицу консервативного олигомерного комплекса Гольджи, который необходим для поддержания нормальной структуры и активности аппарата Гольджи. Кодируемый белок организован с помощью консервативных олигомерных компонентов комплекса Гольджи 5, 7 и 8 в субкомплекс, называемый долей В. Альтернативный сплайсинг приводит к множественным вариантам транскрипта.

CTL4 – мембранный белок, клеточный рецептор суперсемейства иммуноглобулинов, функционирующий как одна из контрольных точек иммунного ответа («чекпойнт»), ингибируя иммунную реакцию, экспрессирован на регуляторных Т-лимфоцитах, в то время как его экспрессия на Т-лимфоцитах повышается только в случае активации последних, что

особенно важно при развитии рака, действует как выключатель, когда он связан с CD80 или CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток.

DAS-28 – индекс активности болезни, состоящий из нескольких дискретных значений активности ревматоидного артрита, объединенных в единый инструмент для оценки тяжести заболевания.

Dominant – доминантная модель наследования, отражающая вариант сравнения генотипов: объединенное сравнение гетерозиготного и вариантного гомозиготного с референтным гомозиготным.

FDR – частота ложных открытий, представляет собой метод концептуализации частоты ошибок первого рода при проверке нулевой гипотезы при проведении множественных сравнений.

ETS1 – фактор транскрипции, который осуществляет прямой контроль экспрессии цитокинов и хемокинов в ходе множества клеточных процессов. Может контролировать дифференцировку, выживание и пролиферацию клеток лимфоидного ряда.

FCRL3 – ген, кодирующий белок способствующий пролиферации, активации и выживанию В-клеток, индуцированных TLR9, он ингибирует выработку антител и подавляет дифференцировку плазматических клеток. Усиливает активацию сигнальных путей NF-kappa-B и MAPK в стимулированных TLR9 В-клетках.

GWAS (англ. genome-wide association studies, GWA study, GWAS) – направление биологических (как правило, биомедицинских) исследований, связанных с исследованием ассоциаций между геномными вариантами и фенотипическими признаками.

HLA-DRB9 – кодирует человеческий ген, Главный комплекс гистосовместимости, класс II, DR бета 9. Он также может быть известен как: основной комплекс гистосовместимости, класс II, DR бета 9 (псевдоген); D6S206; D6S206E; HLA-DR1BL; HLA-DRB1L.

Log-additive – лог-аддитивная модель наследования, отражающая вариант сравнения генотипов: отдельные сравнения одного и двух вариантных аллелей с референтным.

MaAsLin 2 – комплексная многомодельная система для выполнения многомерного ассоциативного тестирования в профилях микробиома – таксономических, функциональных или метаболомных – с модулями анализа для предварительной обработки, нормализации, преобразования и статистического моделирования на основе данных для решения проблем микробной мультиомики.

OTU – оперативная таксономическая единица (OTE): уровень детализации, выбранный исследователем для данной работы, например: индивидуумы, популяции, виды.

Overdominant – сверхдоминантная модель наследования, отражающая вариант сравнения генотипов: объединенное сравнение двух гомозиготных генотипов с гетерозиготным.

PADI4 – ген кодирующий белок, катализирующий цитруллинирование / деиминирование остатков аргинина белков, таких как гистоны.

PTPN22 – лимфоид-специфическая тирозинфосфатаза (lymphoid tyrosine phosphatase - LYP) – является мощным ингибитором активации Т-клеток.

RASGRP1 – ген являющийся членом семейства генов, характеризующихся наличием домена фактора обмена гуаниновых нуклеотидов суперсемейства Ras (GEF). Он активирует каскад киназ Erk/MAP и регулирует развитие Т-клеток и В-клеток, гомеостаз и дифференцировку.

Recessive – рецессивная модель наследования, отражающая вариант сравнения генотипов: объединенное сравнение гетерозиготного и референтного гомозиготного с вариантным гомозиготным.

STAT4 – белок активирующийся белками иммунной системы, называемыми цитокинами, которые являются частью воспалительной реакции для борьбы с инфекцией. При активации белок STAT4 увеличивает активность генов, которые помогают иммунным клеткам, называемым Т-клетками, созреть в специализированные Т-клетки. Эти специализированные Т-клетки, называемые Th1-клетками, вырабатывают специфические цитокины и стимулируют другие иммунные клетки избавляться от чужеродных захватчиков (патогенов) в клетке.

SYNGR1 – ген кодирующий интегральный мембранный белок, связанный с пресинаптическими пузырьками в нейрональных клетках. Он функционирует в синаптической пластичности, не будучи необходимым для синаптической передачи. Генный продукт относится к семейству генов синаптогирина.

TAGAP – ген кодирующий активирующий Rho GTPase белок. Изменения в этом гене могут быть связаны с несколькими заболеваниями, включая ревматоидный артрит, целиакию и рассеянный склероз. Альтернативный сплайсинг приводит к множественным вариантам транскрипта, кодирующим различные изоформы.

TRAF1 – ген кодирующий белок, который играет ключевую роль в передаче сигналов, способствующих выживанию, после членов суперсемейства фактора некроза опухоли TNFR, таких как TNFR2, LMP1, 4-1BB и CD40.

WNT – один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей.

α -разнообразие – разнообразие внутри местообитания или внутри сообщества на видовом уровне.

β -разнообразие – разнообразие между сообществами, показатель степени дифференцированности распределения видов или скорости изменения видового состава, видовой структуры вдоль градиентов среды.

16S рРНК – один из трёх основных типов рРНК, образующих основу рибосом прокариот. Цифры в названии рРНК равны значению константы седиментации.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АД	– артериальное давление
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АСТ	– аспаргатаминотрансфераза
Антитела	– антитела Роберт
Ro/SSA	
Антитела	– антитела Лэйн
La/SSB	
АЦЦП	– антитела к циклическому цитруллинированному пептиду
АЦЦП+	– АЦЦП позитивный
АЦЦП-	– АЦЦП негативный
ВАШ	– визуально-аналоговая шкала
ДАД	– диастолическое артериальное давление
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМТ	– индекс массы тела
ЛЭК	– локальный этический комитет
ОАК	– общий анализ крови
ОАМ	– общий анализ мочи
РА	– ревматоидный артрит
РФ	– ревматоидный фактор
РФ+	– РФ позитивный
РФ-	– РФ негативный
САД	– систолическое артериальное давление
СОЭ	– скорость оседания эритроцитов
СРБ	– С-реактивный белок
ЦМВ	– цитомегаловирус
ЧДД	– частота дыхательных движений
ЧСС	– частота сердечных сокращений
ЧБС	– число болезненных суставов
ЧПС	– число припухших суставов
ФК	– функциональный класс
CD28	– Cluster of Differentiation 28-Кластер дифференциации 28
CD40	– Cluster of Differentiation 40-Кластер дифференциации 40
COG6	– Component of Oligomeric Golgi Complex- Компонент олигомерного комплекса Гольджи
CTL4	– cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, Гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4
DAS-28	– индекс Активности Заболевания 'disease activity score'
FCRL3	– Fc Receptor Like 3-Fc-Рецептор, подобный 3
FFQ	– Food Frequency Questionnaire – Анкета по частоте употребления продуктов питания
GWAS	– Genome wide association study
HAQ	– опросник оценки здоровья – Health Assessment Questionnaire

HLA-DRB9	– Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Beta 9
HP	– хеликобактер пилори, Helicobacter pylori
HWE	– Hardy Weinberg equilibrium- Равновесие Харди-Вайнберга
LefSE	– Linear discriminant analysis Effect Size (Линейный дискриминантный анализ, размер эффекта)
LINC01104	– Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1104 (Длинная межгенная небелковая кодирующая РНК 1104)
MaAsLin 2	– Microbiome Multivariable Associations with Linear Models (Многомерные ассоциации микробиома с линейными моделями)
MAF	– Major allele frequency (Частота основного аллеля)
NLA	– National Laboratory Astana
PADI2	– Peptidyl Arginine Deiminase 2-пептидил-аргинина деиминаза тип 2
PADI4	– Peptidyl Arginine Deiminase 4-пептидил-аргинина деиминаза тип 4
PTPN22	– protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22- нерецепторная тирозин фосфатаза 22 типа
RASGRP1	– RAS Guanyl Releasing Protein 1- RAS Гуанил Высвобождающий белок 1
RT PCR	– Real Time PCR- Полимеразно-цепная реакция в реальном времени
SNP	– Single Nucleotide Polymorphism, Единичный нуклеотидный полиморфизм
SF36	– The Short Form (36) Health Survey, a 36-item – Опросник для оценки качества жизни
STAT4	– Signal Transducer And Activator Of Transcription 4-преобразователь Сигнала и Активатор Транскрипции 4
SYNGR1	– gene (Protein Coding), Synaptogyrin 1- ген (кодирующий белок), Синаптогирин 1
TAGAP	– T Cell Activation RhoGTPase Activating Protein- активирующий Т-клетки активирующий RhoGTPase-белок
TRAF1	– TNF (фактор некроза опухоли) рецептор-ассоциированный фактор 1

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующее поражением суставов, а так же развитием внесуставных проявлений. Частота РА составляет 1% в мировой популяции [1]. Заболевание в 3-5 раз чаще развивается среди лиц женского пола преимущественно в возрасте 25-60 лет [2], соотношение женщин к мужчинам составляет 3:1 [3]. В случае отсутствия своевременной диагностики и лечения данное заболевание в 40-70% случаев приводит к инвалидизации в трудоспособном возрасте [4, 5].

На сегодняшний день доказана роль эндогенных и экзогенных факторов в развитии РА. Генетическая предрасположенность является важным эндогенным фактором, который в наибольшей степени взаимодействует с экзогенными триггерами [6, 7]. В последние десятилетия исследования общегеномных ассоциаций (GWAS) предоставили возможность глубоко изучить генетическую предрасположенность к РА. Выявлено большинство наиболее патогенетически важных в развитии РА HLA и не-HLA генов [8-12]. HLA-DRB1 гены обеспечивают 1/3 генетической предрасположенности к РА [13]. В Казахстане Kurganov и соавт. изучили аллели генов HLA-DRB1, DQB1 и DQA1 среди жителей Астаны и пациентов РА [14, 15]. Роль более 100 локусов не-HLA генов были представлены в широкомасштабном исследовании Okada et al., доказав их ключевую роль в развитии РА [12, p. 379]. Наиболее сильные ассоциации были выявлены с геном PTPN22 и РА в европейской популяции [16, 17], PADI4 в азиатской популяции [18]. Имеющиеся на сегодняшний день исследования, направленные на подтверждение ранее выявленных единичных нуклеотидных полиморфизмов генов РА в различных популяциях, продемонстрировали существенные различия в генетической предрасположенности к данному заболеванию у разных этнических групп [19-24], что в свою очередь является предпосылкой к дальнейшим исследованиям в данном направлении.

Так же актуальны исследования, направленные на изучение триггеров, приводящих к активации того или иного гена РА. Микробиоценоз является одним из ведущих факторов, занимающий существенную нишу в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в том числе РА [25]. Полученные на основе анализа последовательностей ДНК микробных сообществ (секвенирование 16S рРНК) данные показали, что микробиоценоз ротовой полости и кишечника представляют собой наиболее важный фактор, влияющий на проявление аутоиммунных заболеваний [26-29]. Как известно, желудочно-кишечный тракт укрывает самый большой микробиоценоз человека в целом. Одна из других областей, имеющих микробные популяции, влияющие на иммунную систему человека, считается полость рта, которая содержит более 700 видов бактерий, видовое разнообразие которых практически не отличается от кишечного тракта [30]. Ввиду имеющихся данных, что антитела к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) и ревматоидный фактор (РФ)

появляются в слизистой оболочке рта задолго до дебюта РА [31], в совокупности с данными ряда исследований, о том, что *Porphyromonas gingivalis*, экспрессирующая ген PADI4 и тем самым секретирующая белок пептидиларгининдеиминазу (PAD), отвечающий за синтез АЦЦП [32], считается основной патогенной бактерией полости рта, коррелирующая с развитием РА [33, 34], а кишечник играет одну из ключевых ролей в регуляции как иммунитета, так и аутоиммунитета [35, 36], исследование микробиоценоза данных областей имеет большой научный интерес.

Данные имеющихся исследований, посвященных изучению микробиомных маркеров РА, весьма противоречивы. Так, ряд исследований представили *Prevotella copri* как наиболее яркого представителя микробных сообществ кишечника, ассоциированного с развитием РА [37, 38]. В то время как исследования на мышах показали, что *Prevotella histicola* снижает риск развития РА. Это в свою очередь показывает что различные виды бактерий, относящиеся к одному роду могут обладать разными эффектами на аутоиммунитет при РА [39]. К тому же, многочисленные исследования показали различия в микробиоценозе у пациентов с РА в разных популяциях [29, р. 60-3; 37, р. e01202-30]. На сегодняшний день имеются многочисленные исследования микробиома ротовой полости и кишечника при РА в европейской и азиатской популяции, следует отметить, что азиатская популяция представлена преимущественно исследованиями, проведенными в Японии и Китае [40-44]. Число совместных работ, посвященных микробиоценозу ротовой полости и кишечника, ограничено [45], преимущественно данные работы представлены в виде литературных обзоров [46-48]. В России Гульнева М.Ю. и соавт. проведено исследование микробиоценоза кишечника у пациентов с СКВ, склеродермией и системными васкулитами [49]. Таким образом, опубликованных исследований микробиоценоза ротовой полости и кишечника у пациентов с РА в странах центральной Азии, в том числе и в Казахстане, нет.

Цель исследования: Оценить клинические особенности, генетический спектр, состояние и прогностическую значимость микробиоценоза у пациенток с ревматоидным артритом.

Задачи исследования:

1. Изучить клинические особенности течения у пациенток с ревматоидным артритом.
2. Оценить особенности питания у пациенток с ревматоидным артритом.
3. Изучить спектр генетических маркеров у пациенток с ревматоидным артритом.
4. Исследовать состояние микробиоценоза ротовой полости и кишечника у женщин с ревматоидным артритом.
5. Проанализировать взаимосвязь выраженности клинических проявлений с изменениями микробиоценоза у пациенток с ревматоидным артритом.
6. Исследовать состояние микробиоценоза ротовой полости и кишечника на фоне терапии ревматоидного артрита.

7. Изучить прогнозирование клинического течения у исследованных пациенток с ревматоидным артритом.

Объект исследования:

В исследование были включены 82 пациентки женского пола с диагнозом ревматоидный артрит и контрольная группа лиц в количестве 114 человек.

Дизайн исследования: Поперечное одномоментное исследование

Методы исследования:

- клинические методы: сбор жалоб, анамнеза заболевания и жизни, объективное обследование по органам и системам;
- анкетирование по опросникам HAQ, FFQ;
- лабораторные методы исследования;
- общий анализ крови;
- общий анализ мочи;
- биохимический анализ крови;
- электрофорез белков;
- АЦЦП;
- РФ;
- антитела Ro/SSA;
- антитела La/SSB;
- забор биоматериала в виде слюны, кала и крови;
- выделение и амплификация ДНК, подготовка ДНК библиотек;
- ПЦР в реальном времени;
- секвенирование 16S рРНК;
- статистический метод обработки и биоинформатический анализ полученных данных.

Научная новизна.

Впервые проведено комплексное изучение микробиоценоза ротовой полости и кишечника у пациенток с ревматоидным артритом в Казахстанской популяции.

Впервые изучены генетические маркеры: HLA-DRB9 и не-HLA гены у пациенток с ревматоидным артритом в Казахстанской популяции, при этом SNP HLA-DRB9 rs9268839 впервые изучен в Азиатской популяции.

Впервые в Центральноазиатской популяции продемонстрирована ассоциация показателей кишечного микробиома и эффективности терапии при РА.

Практическая значимость.

Результаты исследования генетических маркеров у пациенток с ревматоидным артритом в Казахстанской популяции, особенно SNP HLA DRB9 rs9268839 дополняют и расширяют знания об этиопатогенезе РА.

У пациенток с РА выявлены значимые различия таксонов в микробиоме ротовой полости и кишечника в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рентгенологической стадии, ФК и активности заболевания, что создает возможность прогнозирования активности заболевания, рецидивов и разработки новых терапевтических направлений, нацеленных на микробиом.

Полученные данные настоящего исследования о генетических и микробиомных биомаркерах будут задепонированы и пополнят мировые базы данных по ревматоидному артриту.

Данное исследование позволит изучить структуру микробиома пациенток с РА, с возможностью коррекции выявленных нарушений.

По результатам исследования разработанная прогностическая модель позволяет рассчитать вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов в зависимости от возраста дебюта и симметричности суставного синдрома и рассчитать формирование рентгенологической стадии от уровня СРБ и длительности заболевания.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Исследованные пациентки с РФ-позитивной и АЦЦП-позитивной формой ревматоидного артрита имели более тяжелое течение заболевания, согласно клиническим и лабораторным данным, при этом при исследовании питания больных РА выявлено достоверно недостаточное потребление продуктов, содержащих лактозу, ниацин, алкоголь, полиненасыщенные жирные кислоты и витамин Е.

2. При изучении генетических маркеров выявлено, что единичный нуклеотидный полиморфизм HLA-DRB9 rs9268839 увеличивает шансы развития РА, генотипы нуклеотидов RASGRP1 rs8032939 преобладали как в РФ-позитивной, так и в РФ-негативной форме заболевания, SYNGR1 rs909685 преобладал в РФ-негативной форме РА. Генотипы нуклеотидов PADI4 rs2240340a и STAT4 rs11889341 доминировали как в АЦЦП-позитивной, так и в АЦЦП-негативной форме РА, нуклеотид FCRL3 rs2317230 доминировал в АЦЦП-позитивной форме РА.

3. Таксоны в микробиоме ротовой полости и кишечника достоверно отличались при различных формах РА в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рентгенологической стадии, ФК и активности заболевания, также разнообразие микробиома кишечника имело достоверные различия в зависимости от наличия и вида терапии РА, принадлежность к энтеротипу Prevotella увеличивает шансы развития ревматоидного артрита.

4. Возраст дебюта и симметричность суставного синдрома имеют прогностическое влияние на вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов, а СРБ и длительность заболевания прогностически влияют на формирование рентгенологической стадии РА.

Апробация работы.

Диссертационная работа прошла апробацию на заседании кафедры внутренних болезней с курсами гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии (протокол №9 от 20 апреля 2022 года) и на расширенном заседании (протокол №10А от 30 мая 2022 года).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работы: из них 2 статьи в отечественных изданиях, рекомендованных КОКСОН на момент публикации, 1 статья в издании, имеющий 52 перцентиль (Q2) по CiteScore в базе Scopus и 2 статьи в издании, имеющий 48 перцентиль (Q3) по

CiteScore в базе Scopus, 3 тезиса в сборниках международных конференций, в том числе 1 тезис в сборнике международной конференции APLAR (23rd Asia-Pacific League Associations for Rheumatology Congress) с импакт фактором, имеющий 49% (Q3). Получены 4 авторских свидетельства (Приложения А). В печати публикация по результатам исследования микробиома в издании, имеющий 97 перцентиль (Q1) по CiteScore в базе Scopus.

Результаты работы апробированы и внедрены в отделении узких специалистов, ГКП на ПХВ городской поликлинике №12 г. Астана (Нур-Султан), (Приложения Б).

Объем структура и диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3-х разделов, общих выводов, списка использованной литературы, приложения. Работа изложена на 172 страницах машинописного текста, включает 53 таблицы, 66 рисунков. Список использованной литературы содержит 306 наименования.

1 КЛИНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ И СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЦЕНОЗА У ПАЦИЕНТОК С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 Распространенность ревматоидного артрита

Во всем мире среди наиболее диагностируемых заболеваний после онкологии и кардиологии третье место отведено аутоиммунным заболеваниям [50]. Та же ситуация наблюдается и в Казахстане [51], где аутоиммунными заболеваниями страдают более миллиона наших соотечественников.

Одним из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний является ревматоидный артрит (РА).

Согласно последним данным, общая распространенность РА колеблется от 0,24–0,5% до 1% среди населения земного шара, что делает его одним из наиболее значимых ревматических патологий. Согласно некоторым данным распространенность РА в мировой популяции доходит до 1,3% [52-54].

Известно что женщины в 3-5 раз чаще чем мужчины подвержены ревматоидному артриту, и начальные симптомы заболевания проявляются в третьей декаде жизни, чаще в возрастном периоде от 25 до 60 лет [55, 56]. Более того, мультицентровые исследования доказали более агрессивное течение РА среди лиц женского пола и плохой ответ на терапию в сравнении с мужчинами [57-59]. При отсутствии своевременной диагностики и лечения это заболевание приводит к инвалидизации в 40-70% случаев, а также может привести к летальному исходу в результате осложнений [60, 61].

Согласно данным мировых популяционных исследований на 100 000 человек приходится 25-50 новых случаев РА в год [62]. Уровень преждевременной смерти значительно выше у пациентов с РА по сравнению с населением в целом, что приводит к значительному сокращению продолжительности жизни [63, 64].

Было проведено несколько эпидемиологических исследований РА, которые показали различия в распространенности заболевания среди различных групп населения. Некоторые этнические и расовые группы демонстрируют повышенную заболеваемость РА по сравнению с другими [55, р. 220; 62, р. 1579]. Самая высокая заболеваемость РА, а именно 5,3% наблюдалась среди североамериканских индейцев Пима и 6,8% среди индейцев Юго-Восточной Аляски [65, 66], в то время как РА отсутствует среди сельского населения Нигерии [67, 68] и аборигенов Австралии [69]. По мнению некоторых авторов, в развивающихся странах распространенность РА ниже. Rudan и соавт. представили данные, указывающие на распространенность РА в странах с низким или средним уровнем дохода в Юго-Восточной Азии 0,40%, в Восточной Европе 0,37%, в Европе 0,62%, в Северной и Южной Америке – 1,25%, а в регионе Западной части Тихого океана – 0,42% [70].

В европейских странах распространенность РА так же весьма переменчива, так во Франции она составляет 0,31% [71], 0,35% в Сербии [72], 0,33-0,41% в Италии [73], 0,5% в Испании [74], 0,56% в Турции [75], 0,61% в

России [76], 0,8% в Финляндии, 0,85% в Англии [77] и 0,9% в Польше. Данные Alamanos и соавт. продемонстрировали более высокую заболеваемость РА в северных регионах в сравнении с южными [54, р. 186].

Уровень распространенности РА в Канаде составляет 0,9% [78], аналогично в Польше, а уровень распространенности в США составляет 0,54% [79]. Общая распространенность РА в Африке составила 0,36% [52, р. 14; 70, р. 010409-9], с 0,13% в Алжире [80], 0,2% в Египте, 0,9% в Южной Африке и Конго, и 0,5% в Нигерии [81]. Распространенность РА в Азии варьируется в зависимости от страны. По оценкам, распространенность заболевания в Пакистане составляет 0,142% [82], 0,27% в Южной Корее [83], 0,2% в Китае [84] и 0,75% в Японии [85] и Индии. По последним данным, уровень заболеваемости РА в Казахстане составляет 0,087% [24, р. 753], что близко к уровню заболеваемости в Дании 0,078% [86] и в 2 раза выше, чем заболеваемость в Швеции 0,041% [87] и в Южной Корее - 0,042% [83, р. 1530].

Небольшое количество эпидемиологических исследований для большинства регионов мира и отсутствие таких исследований в большинстве развивающихся стран, затрудняют получение полной глобальной эпидемиологической картины РА.

Согласно данным за 2013-2017 годы, общая заболеваемость РА среди взрослого населения в Республике Казахстан составила 376,7 на 100 000 населения, при этом распространенность увеличилась до 69,1% [51, с. 80]. Несмотря на наличие эпидемиологических тенденций в РА, которые зависят от этнической принадлежности и географического положения, уровень риска является весьма изменчивым показателем.

1.2 Экзогенные факторы, способствующие развитию ревматоидного артрита

Взаимодействие эндогенных и экзогенных факторов играет ключевую роль в развитии РА. Причина более частого развития РА у лиц женского пола не известна, имеются лишь предположения, что данная особенность связана с различием X и Y хромосомных генов и контролируемыми ими гонад и разностью продуцируемых в результате гормонами и их эффектами в сочетании с другими экзогенными триггерами [88]. В то же время, роль эстрогена в развитии РА весьма противоречива, так как он повышает уровень иммуноглобулинов, но снижает выработку провоспалительных цитокинов [89]. Согласно недавнему исследованию Hang et al. эстрогены выполняют протективную роль в отношении суставного хряща при РА, подавляя экспрессию специфического гена [90].

Доказано, что курение значительно увеличивает риск развития РА и занимает доминирующее место в патогенезе РА. Курение приводит к определенным повреждениям легочной ткани, активизируя ферменты пептидиларгининдеиминазы (PAD) и тем самым потенцируя патологический процесс цитруллинирования белков и синтез аутоантител РА [91]. Согласно некоторым данным курение удваивает риск развития РА [92-94]. Мета-анализ

проведенный Sugiyama и соавт. показал, что курение повышает риск развития РА как у мужчин, так и у женщин [95]. Более того ряд исследований продемонстрировало, что не только активное, но и пассивное курение, особенно в детском возрасте значительно повышает риск развития РА [94, р. 22291; 95, р. 79]. Рядом исследований доказано связь курения с повышением провоспалительных цитокинов, активацией генов таких как HLADRB1, RTRN22, PADI4 а также повышение титров антител РФ, АЦЦП и антител к карбамилированному виментину при РА [91, р. 52; 96-98].

Существует ряд других факторов окружающей среды, помимо пола и курения, которые по мнению ученых, играют потенциальную роль в развитии РА, включающих в себя употребление алкоголя, витамин D, использование оральных контрацептивов, высокий вес при рождении, продолжительность грудного вскармливания, беременность, роды, уровень образования, пищевые привычки и даже низкий социально-экономический статус [99].

Широко изучены репродуктивные факторы и их роль в патогенезе РА. Так изменение гормонального статуса женщин во время беременности, родов, кормления грудью, приема оральных контрацептивов, менопаузы может приводить к запуску аутовоспалительных реакций и манифестации РА [100]. Но результаты исследований в данном направлении весьма противоречивы.

Как известно, РА часто развивается у женщин в послеродовом периоде, в то время как сама беременность напротив считается протективным фактором развития РА. По данным Orellana и соавт. у молодых женщин в возрасте 18-44 лет в послеродовой период повышается риск развития АЦЦП -негативного РА [101]. В исследовании Wallenius и соавт. отмечалась высокая частота РА в первые 2 года послеродового периода у первородящих и повторнородящих женщин [102]. Но само количество родов и беременностей в анамнезе имеет защитный характер при развитии РА [103, 104], так согласно данным метаанализа Ren и соавт. количество в анамнезе двух и более родов существенно снижало риск развития РА [105].

Одним из защитных факторов развития РА считается кормление грудью, также немаловажна сама длительность лактации, рядом ученых доказано что у женщин кормивших грудью 1-2 года и более риск развития РА был значительно ниже, чем у не кормящих женщин либо с коротким периодом кормления [106, 107]. Так Chen и соавт. проведя метанализ включавший в себя 6 крупных исследований с участием 1672 женщин, подтвердил негативную корреляцию между кормлением грудью и риском развития РА [108].

Мнение ученых по поводу приема оральных контрацептивов и риском развития РА весьма противоречивы. Так Orellana и соавт. в своем крупном исследовании, включавшее в себя 2641 пациенток с РА и 4251 здоровых женщин, доказали защитную роль приема оральных контрацептивов при развитии РА [109]. В то время как метаанализ Qi и соавт. включавшее в себя 5 когортных и 12 исследований случай-контроль, не доказал защитную роль оральных контрацептивов на риск развития РА среди женщин [110].

Пищевые привычки имеют большой вклад в патогенезе РА, так как являются основным экзогенным фактором, имеющее ежедневное влияние на иммунную систему человека. В патогенезе РА отмечена роль потребления в пищу красного мяса, кофе, алкоголя, сахара, оливкового масла, рыбы, овощей и фруктов и др. [111-113]. Ряд исследований продемонстрировали данные по изучении роли противовоспалительной диеты при РА [114, 115].

Алкоголь считается превентивным фактором при развитии РА, так как снижает уровень провоспалительных цитокинов [116, 117], более того Scott и соавт. доказали его защитную роль в развитии прогностически неблагоприятного АЦЦП-позитивного РА [118]. Но исследование Müller-Ladner и соавт., использовавшее менделевский рандомизационный анализ, не выявило причинно-следственную связь между потреблением алкоголя и риском развития РА [119]. Напротив употребление сахаросодержащих газированных напитков увеличивает риск развития РА [120].

Потребление мучных изделий, маргарина, кофе [121], соли и красного мяса, также ассоциировано с потенцированием манифестации РА [111, р. 689698-51]. В то время как средиземноморская диета, богатая овощами, фруктами, рыбными изделиями, оливковым маслом, по мнению многих авторов, обладает протективным действием в развитии РА [122, 123]. Так Giuseppe и соавт. проведя метаанализ, обнаружили обратную связь между потреблением рыбы и РА [124]. Однако имеются и противоречивые данные, не обнаружившие статистически значимой взаимосвязи между средиземноморской диетой и РА [125, 126].

Инфекционные агенты, такие как вирус Эпштейн-Барр, вирусы гепатитов В и С, краснухи, парвовирус, цитомегаловирус, микоплазма, хламидия и др. показали взаимосвязь с развитием РА [127-129]. Недавно Youseffi et al. представили систематический обзор и метаанализ, где продемонстрировали взаимосвязь *Helicobacter pylori* с развитием нескольких аутоиммунных заболеваний, в том числе РА [130].

Ряд исследований доказали взаимосвязь между витамином D и РА, дефицит витамина D преобладает у пациентов с РА по сравнению со здоровыми лицами, а уровень витамина D обратно коррелирует с активностью РА. Так же отмечена роль дефицита витамина D в развитии РА [131, 132].

Так же доказана немаловажная роль социо-экономического статуса на развитие РА, так к примеру низкое образование по данным некоторых исследований ассоциировано с серопозитивным РА [133, 134].

1.3 Особенности дебюта и клинические характеристики ревматоидного артрита

Клиника РА разнообразна и складывается из суставных и системных проявлений. Синовит, как основной виновник, приводит к разрушению суставов и ранней инвалидизации. В патологический процесс может быть вовлечен любой сустав, что приводит к основному клиническому симптому РА – симметричному полиартриту [135, 136]. РА наиболее характерно хроническое

симметричное поражение проксимальных межфаланговых и пястно-фаланговых суставов, зачастую сопровождающееся припухлостью и скованностью одноименных суставов. При наличии поражения в данных суставах по критериям ACR 2010 начисляется наивысший балл и достоверней выставляется диагноз РА [137]. При прогрессировании заболевания в патологический процесс вовлекаются и крупные суставы. Деструкция суставов при отсутствии своевременной диагностики и лечении, при неэффективности терапии приводит к деформациям суставов, таких как шея лебедя, ульнарная девиация, бутоньерка, лорнетка, вальгусная деформация, тиббиальная девиация.

Конституциональные симптомы, такие как усталость, лихорадка, выпадение волос, потеря веса, вплоть до кахексии часто развиваются параллельно с суставным синдромом, либо опережают его. Хотя данные о весе весьма противоречивы, имеются данные о том, что избыточный вес и ожирение были ассоциированы с более высокой активностью РА [138, 139], DAS 28 у данных пациентов был значительно высок, из-за большего количества ЧБС и ЧПС [140].

Серопозитивный РА считается клинически и прогностически неблагоприятной формой заболевания. Серопозитивность определяется наличием двух антител, а именно РФ и АЦЦП при РА [141], наличие которых значительно утяжеляет течение заболевания, присутствие данных антител ассоциировано с быстрым развитием деформаций, висцеральных поражений и осложнений и даже высоким риском смертельного исхода [142]. Также наличие данных аутоантител способствует повышению активности по DAS28, прогрессированию рентгенологической стадии [143-144], более тяжелых изменений по данным УЗИ суставов [145] и низкой вероятности достижения ремиссии в результате лечения РА. В то время как Voeters и соавт. продемонстрировали данные о том, что АЦЦП негативные пациенты достигали стойкой ремиссии, после отмены лечения болезнью-модифицирующими препаратами [146]. Науке известны случаи конверсии серопозитивного РА в серонегативный, чаще на фоне эффективной терапии болезнью-модифицирующими препаратами. Так Bohler и соавт. в своем исследовании отмечали снижение РФ и АЦЦП после 6 мес лечения РА [147].

По некоторым данным АЦЦП является ранним маркером еще не развившегося РА, характеризуясь увеличением титров за 10 лет до манифестации РА [148-150].

Системные проявления, такие как ревматоидные узелки, серозиты, васкулит, невропатия, поражения глаз и синдром Шегрена, также могут иметь место и ухудшать прогноз РА. Риск развития внесуставных проявлений коррелирует с активностью РА. Известны предикторы развития данных внесуставных поражений, такие как женский пол, курение, высокие уровни маркеров воспалительного процесса, высокий титр РФ, наличие АЦЦП и носительство HLA-B1 SE. Как было упомянуто выше, положительность по РФ и АЦЦП связана не только с ранней деструкцией суставов, но и развитием внесуставных проявлений и развитием осложнений РА. Так к примеру АЦЦП и

РФ были ассоциированы с развитием интерстициального заболевания легких при РА [151].

Самым распространенным внесуставным проявлением, встречающийся у 30-40% пациентов с РА являются ревматоидные узелки [152, 153]. В то время как синдром Шегрена и серозиты наблюдаются лишь у 10% пациентов [154]. Согласно данным Nyhäll-Wåhlin и соавт. наличие ревматоидных узелков ассоциировалось с АЦЦП-позитивностью и значительной рентгенологической прогрессией РА через 5 лет [155].

Васкулит зачастую развивается параллельно с ревматоидными узелками. У РФ-позитивных пациентов развитие васкулита гораздо выше чем у РФ-негативных пациентов [156]. По некоторым данным васкулит развивается в среднем при продолжительности РА более 10 лет у 5% пациентов, и характеризуется высокими титрами РФ и деформациями суставов [157].

Склериты и эписклериты в качестве внесуставных проявлений встречаются в 0,17-6,3% РА и часто отягощают течение, прогноз и лечение РА [158]. Риск поражений глаз значительно увеличивается с продолжительностью заболевания [154, р. 102735].

Одним из грозных экстраартикулярных проявлений, развивающееся у около 10% пациентов с РА- перикардит и миокардит, особо негативно влияют на качество и продолжительность жизни пациентов с РА, ввиду риска развития тампонады и кардиогенного шока [154, р. 102735; 159].

У 40-60% пациентов с РА в качестве внесуставных проявлений развивается поражение легких, которое чаще характеризуется развитием плеврита, интерстициального заболевания легких и синдрома Каплана [160]. Более того легкие по многочисленным данным являются первичной локализацией цитруллинизации белков, способствующей к запуску аутоиммунной реакции при развитии РА [1, р. 2035; 91, р. 53; 100, р. 3109-24; 161].

Согласно систематическому обзору и метаанализу Alani и соавт. вторичный синдром Шегрена встречается у 55% пациентов с РА [162]. Считается что наличие данного синдрома значительно отягощает течение РА и ухудшает ответ на терапию и прогноз заболевания, хотя в недавнем исследовании Kim и соавт. были получены протеворечивые результаты, в их исследовании клинические характеристики и активность РА не имели достоверных различий в зависимости от наличия синдрома Шегрена, несмотря на то что аутоантитела РА и антитела Ro/SSA, как и антитела La/SSB были повышены у пациентов, имевших данное внесуставное проявление [163].

Неврологические внесуставные проявления РА, встречающиеся у 20% пациентов [164], развиваются в результате злокачественного течения васкулита и характеризуются развитием мононеврита или полиневропатии [165].

К осложнениям РА относятся амилоидоз, системный остеопороз, остеонекроз, вторичный остеоартроз, подвывихи атланта-аксиального сочленения, атеросклероз и туннельные синдромы, которые в свою очередь

значительно ухудшают качество жизни пациентов с РА и повышают риск смертельного исхода.

Повышение маркеров воспаления, таких как СРБ и СОЭ типично для развития РА [1, р. 2033-2034], данные показатели так же вошли в классификационные критерии ACR 2010, а также данные показатели используются для высчитывания активности РА по калькулятору DAS28.

1.4 Генетическая предрасположенность к ревматоидному артриту

Одним из основных пусковых механизмов развития ревматоидного артрита и ведущих эндогенных факторов является генетическая предрасположенность. Исследования общегеномных ассоциаций (GWAS) позволили выявить ряд генов HLA и не-HLA системы, которые приводят к манифестации РА [166-171]. Так Okada и соавт. провели масштабное исследование с целью выявления 100 локусов генов РА, не относящихся к HLA системе, подтвердив их ключевую роль в развитии РА [12, р. 378]. Генетическая предрасположенность к РА вариабельна в разных популяциях [172].

Согласно многочисленным исследованиям, основные гены комплекса гистосовместимости II класса, в частности, человеческие лейкоцитарные антигены (HLA)-DR, продемонстрировали большой вклад в развитие РА [173], на их долю приходится около 30% наследуемости при РА [8, р. 175]. Было признано, что HLA-DRB1 и его общий эпитоп (SE) играют ключевую роль в развитии РА, доказана взаимосвязь наличия данных генов с тяжестью заболевания [174] и наличием АЦЦП [175, 176]. Так связь с этими генами и развитием внесуставных проявлений у пациентов с РА была доказана несколькими исследованиями [177, 178]. Исследования на близнецах так же подтвердили роль HLA-DR генов в развитии РА [179]. Traylog и соавт. провели метаанализ семи GWAS и подтвердили связь между общим эпитопом HLA-DRB1 и рентгенологическими изменениями при РА [171, р. e0223246-12].

Исследования с участием 30 тыс. пациентов РА, продемонстрировали ассоциацию HLADR-B9 гена с развитием РА в европейской популяции, G/T генотип повышает риск развития РА в 2 раза, в то время как G/G генотип повышает риск развития РА в 4 раза [180]. В Казахстане Kuranov и соавт. изучили аллели генов HLA-DRB1, DQB1 и DQA1 среди жителей Астаны [15, р. e115265-14], продемонстрировав результаты сравнения их генетической взаимосвязи между мировыми популяциями. Так же Kuranov и соавт. проведено исследование данных аллелей среди пациентов РА в Казахской популяции, которое продемонстрировало превалирование HLA-DRB1 гена [14, р. 190-191]. Таким образом гены системы HLA, безусловно, занимают огромную нишу в исследованиях этиопатогенеза РА и требуют особого внимания и дальнейшего изучения.

Гены за пределами HLA системы являются актуальным предметом научных поисков на сегодняшний день. Таким образом, RTPN22 регулирующий сигнальные пути Т-клеток [181] в исследовании Nab1 и соавт. показал высокую

связь с восприимчивостью к РА в Европейской популяции, однако не было никакой связи этого SNP с РА в Азиатской популяции [182]. Систематический обзор, включавший 52 исследования "случай–контроль", выявил значительную корреляцию нуклеотида rs2476601 гена RTPN22 с РА во всех моделях наследования. Согласно исследованиям данный SNP преобладает в европейской и африканской популяциях [183]. Newman и соавт. продемонстрировали ассоциацию RTPN22 с высоким риском формирования аутоиммунных заболеваний щитовидной железы у пациентов с РА, что, в свою очередь, ухудшает прогноз заболевания [184]. Этот ген также был идентифицирован у пациентов с ювенильным идиопатическим артритом, который в дальнейшем может трансформироваться в РА [185].

Процесс цитруллинирования, играющий существенную роль в манифестации РА, осуществляется с участием ферментов пептидиларгининдеминаз (PADS) [186]. PADI4 (пептидиларгининдеминаза 4), в свою очередь, способствует развитию РА за счет катализации цитруллинирования аргинина, измененный белок связывается с BRD4 (Bromodomain-containing protein 4 хроматинсвязывающий белок), образуя комплекс, потенцирующий воспалительный процесс через активацию генов [187, 188]. Рядом исследований доказана ассоциация PADI4 с развитием РА среди азиатской популяции [189-191]. Plenge и соавт. и Cheng и соавт. выявлена высокая ассоциация PADI4 с РА у населения Северной Америки и Китая [192, 193]. Однако Cheng и соавт. в другой работе продемонстрировали противоречивые результаты, не выявив никаких доказательств связи носительства PADI4 с развитием РА среди населения Хань [194]. Mergaert и соавт. также была выявлена сильная взаимосвязь PADI4 с РА у североамериканской когорте [195]. Согласно крупнейшему исследованию Burr и соавт. генотип PADI4 не был связан с РА в европейской популяции [196]. Шведские, французские, британские и испанские данные также подтверждают отсутствие связи этого SNP с восприимчивостью к РА [197, 198]. Существуют некоторые исследования, которые были направлены на изучение взаимосвязи PADI2 с восприимчивостью к РА и подтвердили это [19, p. 718246-15; 186, p. 12]. Guzman и соавт. в недавнем исследовании была показана сильная корреляция этого гена с РА в раннем возрасте у мексиканской популяции [19, p. 718246-16].

Основной механизм патогенеза РА включает различные пути активации Т-клеток. CTLA-4, CD28 и CD40 являются генами, которые занимают важное место в процессах стимуляции и ингибирования Т-клеток.

CTLA4 (цитотоксический белок, ассоциированный с Т-лимфоцитами 4) - ген, отвечающий за ингибирование и регуляцию Т-клеток [199]. Несколько метаанализов продемонстрировали взаимосвязь CTLA4 с развитием РА [189, p. 293; 190, p. 322; 191, p. e0193674-7]. Walker и соавт. представили исследование, подтверждающее ассоциацию этого гена у канадских пациентов с РА [200], в то время как Aslam и соавт. выявлена генетическая ассоциация CTLA4 с риском развития РА у пакистанской популяции [201]. Zhou и соавт.

проведен метаанализ, подтверждающий связь полиморфизмов этого гена с риском развития РА как в азиатской, так и в европейской популяции [202].

CD28 ген, кодирующий белок, обеспечивающий пролиферацию Т-клеток, в частности Т-хелперов, а также синтез провоспалительных цитокинов [203]. Недавнее исследование Luterek-Puszyńska и соавт. не показало какой-либо значимой корреляции между полиморфизмами генов CD28 r и CTLA-4 и пациентами с РА в Польше, однако в этой когорте была выявлена слабая связь между полиморфизмом гена CTLA-4 и активностью РА, что требует дальнейших исследований [204].

CD40 относится к суперсемейству TNF-рецепторов, кодирующий белок-рецептор на антигенпрезентирующих клетках и играет решающую роль в различных иммунологических реакциях, таких как взаимодействие иммуноглобулинов и образование В-клеток [205]. Гиперактивация и пролиферация аутореактивных CD4+Т-клеток, которые непосредственно участвуют в активации В-клеток и выработке аутоантител, является ключевым моментом в патогенезе РА [206]. Все эти процессы неумолимо приводят к воспалительному процессу, повреждению всех компонентов суставов и внесуставным проявлениям. Более того, CD40 регулирует передачу костимуляционного сигнала между Т-лимфоцитами, который поддерживает воспалительный процесс при РА [207]. Fernández и соавт. изучая корреляцию гена CD40 и клинических особенностей РА, выявили изменение экспрессии локусов этого гена у пациенток с РА [208]. Liao и соавт. также была показана связь CD40 с РА у пациентов женского пола [209].

STAT4 представляет собой ген, кодирующий белок, который в ответ на действие провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина 12, активируют процесс транскрипции. Этот белок также играет существенную роль в процессах дифференцировки и пролиферации Т-клеток [210]. Несколькими исследованиями доказана роль данного гена в развитии РА [211, 212]. Elshazli и соавт. проведен метаанализ, подтверждающий связь RTRN22 rs2476601 и STAT4 rs7574865 с восприимчивостью к РА в основных этнических группах [213]. Jiang и соавт. представил исследование, описывающее корреляцию STAT4 с РА в азиатской когорте [214].

TAGAP играет важную роль в активации Т-клеток за счет способности изменять молекулярную структуру клеток [215]. Chen и соавт. подтвердили вклад этого гена в развитие РА [193, p. 1162]. По данным Chatzikyriakidou и соавт. однонуклеотидный полиморфизм rs212389 гена TAGAP наиболее ассоциирован с РА [216]. Известна ассоциация данного полиморфизма с РА в Европейской и Азиатской популяциях [10, p. 512]. В исследовании Castro-Santos и соавт. локусы гена TAGAP показали значительную ассоциацию с РА наряду с локусами STAT4 в популяции Латинской Америки [217]. В то время как Perkins и соавт. обнаружили, что аллели TAGAP rs1738074 и rs4709267 ассоциированы с РА в здоровой когорте афроамериканцев по сравнению с основной группой РА [218].

COG6 ген, обеспечивающий нормальное функционирование аппарата Гольджи [219]. Márquez и соавт. выдвинули этот ген как один из тех, которые участвуют в запускающих процессах развития РА, и выявили сильную связь локусов этого гена с восприимчивостью к заболеванию у пациентов с РА и системной красной волчанкой (СКВ) [220]. Полиморфизмы этого гена также связаны с развитием псориатического и ювенильного идиопатического артрита [221, 222].

TRAF1 ген, кодирующий белок- член суперсемейства TNF, с помощью сложных механизмов и антиапоптотических сигналов [223]. Интересным фактом является то, что вирус Эпштейна-Барра, который является основным триггером РА, стимулирует экспрессию этого гена [224]. В исследовании Plenge и соавт. была показана значительная связь RPTN22 и TRAF1 с дебютом РА [225]. Ассоциация этого гена и радиологического прогрессирования при РА была выявлена в египетской и исландской когортах [226, 227].

SYNGR1 ген, кодирующий белок, расположенный в мембране нейрональных клеток [228]. Функция этого белка до сих пор полностью неизвестна науке, было проведено несколько исследований на мышах, согласно которым можно предположить, что этот белок функционирует в синаптической пластичности [229]. Несмотря на то, что ранее этот ген чаще ассоциировался с шизофренией [230], на сегодняшний день существует несколько работ, подтверждающих роль этого полиморфизма в развитии СКВ [231] и РА [232, 233]. Таким образом, Liu и соавт. выявлена сильная ассоциация с риском развития РА и присутствием этого гена в европейской и корейской популяциях [232, p. 103389].

RASGRP1 участвует в регуляции развития Т-клеток и В-клеток, их гомеостаза и дифференцировки [234]. Ruiz-Larrañaga и соавт. получены данные, подтверждающие вклад RASGRP1 в формирование РА у европейской популяции [235]. Исследование Golinski и соавт., которое включало пациентов с РА, получавших лечение ингибиторами TNF, выявил нарушение регуляции RASGRP1 у пациентов с РА [236].

ETS1 кодирует белок, один из факторов транскрипции, действие которого приводит к активации или репрессии большого числа генов, в результате чего играет важную роль в созревании стволовых клеток, жизненном цикле клеток и развитии опухолевого процесса [237]. Zhang и соавт. определили связь между генотипом ETS1 rs1128334 G/A с высоким риском развития РА в китайской популяции [238]. Этот ген также был связан с образованием костной эрозии у пациентов с РА из китайской популяции [239]. Была обнаружена определенная ассоциация этого гена с синдромом Шегрена, что в свою очередь, значительно усугубляет течение и ухудшает прогноз ревматоидного артрита [239, p. e0134875-10].

FCRL3 кодирует белок, представляющий собой Fc-рецептор-подобный гликопротеин, способный влиять на активацию иммунорецепторов-тирозина, а также подавлять одноименный процесс [240]. Мутации в этом гене были связаны не только с РА, но также с аутоиммунным тиреоидитом и СКВ.

Newman и соавт. провели исследование с целью оценки генов FCRL3 и PTPN22 и получили противоречивые результаты, такие как отрицательная корреляция между аллелем PTPN22 и С аллелем FCRL3 при формировании РА ($p=0,0008$, $p=0,001$ соответственно), более того, присутствие FCRL3 снижало риск АИТ у пациентов с РА [184, р. 3824]. Ramírez-Bello J и соавт. сообщалось, что SNP гена FCRL3 проявлял защитные свойства в комбинированных случаях ювенильного ревматоидного артрита и астмы у мексиканских пациентов с РА мужского пола [241]. Недавнее исследование Lin и соавт. выявило значительную связь FCRL3 генотипа Т/С с повышенным риском формирования АЦЦП-позитивного РА у китайской ханьской популяции [242].

LBH является регулятором сигнального пути WNT [243]. Согласно Ekwall и соавт. этот ген, регулируемый факторами роста, играет ведущую роль в патологических процессах в суставах при РА, а именно приводит к гиперплазии синовиальной оболочки [244]. Вклад локусов данного гена в формирование РА был отмечен в нескольких исследованиях [245, 246]. В исследовании Sun и соавт. не было выявлено никакой связи LBH с РА среди китайского населения. Однако было отмечено снижение уровня мРНК LBH в мононуклеарных клетках периферической крови [243, р. 30549979].

Ассоциация локуса гена LINC01104 с развитием РА также была выявлена в ряде GWAS [10, р. 510; 12, р. 379].

Danilla и соавт. провели исследование, направленное на оценку вклада генов, ранее подтвержденных у других этнических групп, в афроамериканской популяции. Согласно их данным, HLA-DRB1 показал самую сильную корреляцию с восприимчивостью к РА, в свою очередь локусы генов CTLA4, TRAF1 и ETS1 были связаны с рентгенографической тяжестью и деформацией суставов у пациентов с РА [247]. Allam и соавт. в своем исследовании распределения полиморфизмов PTPN22 (rs2476601) и PADI4 (rs2240340), не смогли обнаружить никаких доказательств наличия этих SNPs у алжирских пациентов с РА, однако была выявлена корреляция между серопозитивной формой РА и PTPN22 (rs2476601) [21, р. 1000586-5]. Исследование Zhu и соавт. изучая генетическую предрасположенность к РА среди европейских и азиатских популяций, выявило 221 новых генов, связанных с РА, и 20 из них были высоко верифицированы: TUBB, HSP90AB1, RPS18, BRD2, PHTF1, MAPK13, BAK1, HLA-F, IER3, RNASET2, HLA-G, ZKSCAN4, HFE и др. [248]. Laufer и соавт. представили исследование ассоциаций 33 генов, ранее ассоциированных с РА у лиц евро-азиатской этнической принадлежности в афроамериканском населении, кроме того, в этом исследовании также проверялась распространенность 4 новых полиморфизмов, ассоциированных с РА, таких как PADI2 rs761426, CSMD3 rs2203098, GPC5 rs9516053 и RBFOX1 rs4602043, которые показали значимость по крайней мере в одной из популяций мира [249]. В недавнем исследовании Leng и соавт. провели GWAS для 1027 случаев РА и 2879 контрольных лиц, выявив пять новых локусов восприимчивости (IL12RB2, BOLL-PLCL1, CCR2, TCF7 и IQGAP1) к РА в китайской популяции [250]. Согласно GWAS, проведенному Hayashi и соавт.

GALNT12 rs2295926 и KCNN2 rs11958855 были тесно связаны с быстрым разрушением суставов при РА [167, p. 31-9].

Безусловно, изучение генетической предрасположенности к РА требует дальнейших обширных исследований. Часть данного раздела диссертации была опубликована в качестве обзорной статьи [251].

1.5 Особенности микробиоценоза при ревматоидном артрите

На сегодняшний день широко изучается роль микробиома, как одного из мощнейшего триггера в развитии аутоиммунных заболеваний. Как известно, ЖКТ укрывает самый большой микробиом человека, являясь средой обитания для более чем 3 тыс. видов бактерий [252, 253]. Одна из других областей, имеющих микробные популяции, которая, как полагают, значительно влияет на иммунную систему человека считается полость рта, которая содержит более 600-700 видов бактерий [254], видовое разнообразие которых практически не отличается от кишечного тракта [255, 256].

Ввиду того что иммуноглобулин А (IgA) АЦЦП обнаруживается у пациентов до начала манифестации заболевания, возникло предположение, что РА зарождается на слизистых участках, таких как ротовая полость и кишечник [31, p. 69; 48, p. e45931-2].

Многими авторами продемонстрировано, что микробиота кишечника может действовать как триггерный фактор, вызывающий аутоиммунные заболевания [257], в том числе и РА [258-261].

Современные методы секвенирования представили возможным по фрагменту гена 16S рРНК выстраивать бактериальные деревья [25, p. 8] что в свою очередь расширило возможности изучения микробиома.

Smolen и соавт. визуально продемонстрировали взаимосвязь генетической предрасположенности, экзогенных факторов, особенно курения, статуса микробиома ротовой полости, бронхов и ЖКТ, ведущее к патологическим процессам как цитруллинизация, нарушение толерантности иммунной системы и в итоге к манифестации РА [1, p. 2032].

Следовательно, полученные на основе анализа последовательностей ДНК микробных сообществ данные показали, что микробиом представляет собой важный фактор окружающей среды, который может влиять на проявление аутоиммунных заболеваний [262] и поэтому многие исследователи проявляют интерес к изучению данной области.

Однако мнения исследователей расходятся; некоторые предполагают, что изменения в микробиоме являются пусковым механизмом в патогенезе РА, в то время как другие утверждают, что изменения в микробиоме вторичны по отношению к РА. Ранние изменения в кишечном микробиоме при РА характеризуются увеличением числа нескольких родов и типов, включая *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Gordonibacter*, *Eggerthella*, *Collinsella*, *Actinobacteria* и *Lachnospiraceae*, а также уменьшением протеобактерий, *Firmicutes* и *Faecalibacterium* [263]. По данным Balakrishnan и соавт. *Collinsella aerofaciens* вызывают обострение артрита в моделях на мышцах [264].

На сегодняшний день науке известно несколько механизмов инициации ревматоидного артрита: производство цитруллинированных пептидов *Porphyromonas gingivalis* и активация иммунных реакций с помощью клеток Th17 *Prevotella copri*. Первый из них вызывает цитруллинизацию, которая способствует патологическим процессам, приводящим к развитию и прогрессированию РА. Так при РА были обнаружены высокие уровни антител к *P. gingivalis* в сыворотке крови, это основная патогенная бактерия заболеваний пародонта, может коррелировать с развитием РА [265, 266], поскольку эта бактерия является единственным известным патогеном, который экспрессирует пептидиларгининдеиминазу (PADI4) и способствует выработке АЦЦП в ротовой полости. Sher и соавт. сообщалось, что относительная численность *Prevotella copri* была увеличена у пациентов с РА в дебюте заболевания по сравнению со здоровыми пациентами. Впоследствии было продемонстрировано, что реакция антител к *P. copri* была повышена у пациентов с РА по сравнению с контрольной группой [267]. Так согласно данным Maeda и соавт. преобладание *Prevotella copri* в кишечнике приводит к развитию РА [29, p. 60-7; 41, p. 108]. В то время как Marietta и соавт. на моделях на мышах выявили что увеличение в кишечнике *Prevotella histicola* снижает риск развития РА [268]. У пациентов с РА *de novo* повышенная распространенность *Prevotella* в желудочно-кишечном тракте вытеснила *B. fragilis*, бактерии с заметной активностью Treg [269]. Повышенное количество *P. copri* и аналогичных видов связано с низкими титрами полезных организмов, и это изменение может подавлять иммунную систему и расщепление витаминов на компоненты, всасываемые в кровоток [33, p. 455; 269, p. 1503]. Так согласно данным Pianta и соавт. распространенность в кишечнике *P. copri* была выше в первый год манифестации заболевания, и, в частности, дисбактериоз, обнаруженный у лиц с РА, не был полностью устранен после терапии болезнью модифицирующими препаратами [270]. Филогенетические ассоциативные тесты в метагеномном исследовании Kishikawa и соавт. продемонстрировали высокую распространенность множества видов, принадлежащих к роду *Prevotella* (*P. denticola*, *P. marshii*, *P. disiens*, *P. corporis* and *P. amnii*) в группе РА, данное исследование также продемонстрировало превалирование *Prevotella spp.*, которые значительно отличаются от *P. copri*, в микробиоме кишечника РА [41, p. 109].

Аналогичным образом, слизистая оболочка десен тесно связана с патогенезом РА посредством специфических бактерий, таких как *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* и *Cryptobacterium curtum* [271]. *A. actinomycetemcomitans*, продуцирует лейкотоксин, который может разрушать клеточную мембрану нейтрофилов, приводя к гиперцитруллинации [272]. Совсем недавно в исследовании сообщалось о другом профиле микробиоты полости рта у пациентов с РА по сравнению с пациентами с остеоартритом и здоровыми субъектами; у пациентов с РА преобладали 8 родов бактерий, включая *Prevotella*, *Streptococcus*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Rothia*,

Actinomyces, *Granulicatella*, *Leptotrichia* и *Lautropia* у пациентов с РА [44, p. 17126-11].

Vaahтовuo и соавт. [269, p. 1503] проанализировали содержание микробиоты кишечника пациентов с ранним РА или фибромиалгией, используя проточную цитометрию, гибридизацию 16S рРНК и окрашивание ДНК. У пациентов с РА было снижено количество родов *Bifidobacterium* и *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* из подгруппы *Bacteroides fragilis*, что согласуется с более ранними сообщениями о лицах с болезнью Крона [273].

Согласно исследованию на мышах Abdollahi-Roodsaz и соавт., на уровне рода лактобациллы были истощены в группе РА по сравнению с их обилием в контрольной группе. *L. bifidus* может вызывать отек суставов у мышей [274]. В то время как Zhang X и соавт. проведя исследование, основанное на метагеномном секвенировании, сообщили об увеличении количества *Lactobacillus salivarius* в кишечнике и в слюне пациентов с РА, однако количество видов *Haemophilus* значительно сократилось [45, p. 901]. Liu et al. документально подтвердили, что фекальные виды *Lactobacillus* были более многочисленны у пациентов с РА в Китае по сравнению со здоровыми людьми из контрольной группы [275].

Исследование проведенное Sun Y. и соавт. показали, что разнообразие и состав микробиома кишечника пациентов РА отличался от такового у здоровых контрольных субъектов в Китае. Увеличение *Bacteroides* и *Escherichia-Shigella* в сочетании со снижением *Lactobacillus*, *Alloprevotella*, *Enterobacter* и *Odoribacter*, по-видимому, характерно для РА у пациентов из Шанхая, Китай [276]. Эти результаты отличаются от результатов других исследований, проведенных за пределами Китая [277].

Bacteroides занимают определенную нишу в патогенезе развития РА [278]. Анализ, изучаемых в последние годы, путей KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) выявили значимые ассоциации, некоторых веществ, относящихся к этим путям, с патофизиологией РА следующим образом:

1. Жирные кислоты связаны с воспалением, и, как сообщается, у пациентов с ревматоидным артритом повышается регуляция нескольких свободных жирных кислот в сыворотке крови.

2. Терпеноиды подавляют передачу сигналов ядерного фактора-кВ, главного регулятора патогенеза воспалительных заболеваний. Они являются основным компонентом *Tripterygium wilfordii*, растения, используемого в традиционной китайской медицине, которое, как было показано, не уступает метотрексату при лечении РА.

3. Адипоцитокينات способствуют провоспалительному состоянию РА, увеличиваясь в синовиальной жидкости пациентов с РА.

4. Гликозаминогликаны (ГАГ) являются основными компонентами суставного хряща и других мягких соединительных тканей. Модификация метаболизма ГАГ может играть решающую роль в патогенезе РА [279, 280].

Данные результаты предполагают, что вышеупомянутые вещества играют ту или иную роль в патологическом процессе в кишечнике, ассоциированном с

развитием РА. Так функциональный анализ этих путей KEGG, связанных с последовательностями гена 16S рРНК и различиями в микробиомах пациентов с РА и здоровых контрольных групп, предоставил доказательства того, что некоторые функции микробов, включая биосинтез некоторых вторичных метаболитов, деградацию ксенобиотиков, метаболизм и эндокринную систему, могут быть нарушены у пациентов с РА. Однако эти пути также были истощены у *Bacteroides*, бактериального рода, обогащенного группой РА. Эти результаты указывают на то, что состав кишечной микробиоты может способствовать возникновению или развитию РА через изменение микробной функции.

По мнению некоторых авторов, была продемонстрирована высокая значимая ассоциация гена R6FCZ7; этот белок выполняет широкий спектр бактериальных функций, таких как перенос электронов, окислительно-восстановительный катализ и регуляция генов. В нескольких предыдущих исследованиях сообщалось, что активные формы кислорода играют важную роль в патогенезе РА. В этих данных метагенома последовательности R6FCZ7 были дополнительно связаны с таксономическими эталонными геномами *Bacteroides uniformis*, *B. rodentium* и *B. fragilis*, а также *Bacteroides* sp. Это означает, что несколько видов, принадлежащих к роду *Bacteroides*, функционально обладают этим геном. В целом, результаты показывают, что окислительно-восстановительная функция микробиома, особенно рода *Bacteroides*, может играть важную роль в патологии РА [281].

Таким образом, на данный момент известно, что микробиом при РА характеризуется увеличением *Prevotellaceae*, *Prevotella* spp. [282], *Collinsella aerofaciens* and *Eggerthella lenta* [283], *Verrucomicrobia*, *Akkermansia* [284], *Prevotella* [285], *Lactobacilli*, *Clostridiaceae* [286], *Bacteroides*, *Lactobacillus salivarius*.

И снижением числа *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides*, *Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides*, *Haemophilus* spp.

Многочисленные исследования микробиома РА в разных популяциях показали различия в микробиоме кишечника, так, к примеру в США и Японии отмечался рост *Prevotella copri* и снижение *Bacteroides* [37, p. e01202-30; 39, p. 2885], в то время как в Китае у пациентов с РА отмечалось повышение *Clostridium asparagiforme*, *Lactobacillus salivarius* и снижение *Veillonella*, *Haemophilus* в кишечнике [40, p. 249]. *Vaahrovuo et al.* обнаружили, что подгруппа *Bacteroides fragilis*, род *Bifidobacterium* и *Eubacterium rectale-Clostridium coccoides* уменьшены у пациентов с РА [41, p. 108].

Ученые *Shandong Normal University* и *Shandong Academy of Medical Sciences* исследовали микробиом пациентов с РА и остеоартрозом (ОА) в сравнении со здоровой группой контроля, в результате у пациентов с РА было достоверно больше *Neisseria subflava*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Veillonella dispar*, *Prevotella tanneriae*, *Actinobacillus parahaemolyticus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Aggregatibacter*,

Actinobacillus в ротовой полости в сравнении с пациентами с ОА и здоровой группой лиц, более того 8 из них были выделены как биомаркеры заболевания [44, p. 17126-11].

Konig M.F. и соавт. показали устойчивые ассоциации антител, распознающих *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* с риском развития РА, в дополнение к демонстрации того, что этот организм индуцирует гиперцитруллинацию в нейтрофилах хозяина, генерирующих цитруллином, который играет ключевую роль в развитии РА [287].

Mikuls T.R. и соавт. изучая под десневой микробиом пациентов с РА и ОА не обнаружили значимых корреляций *A. Geminatus* или *P. gingivalis*, или *Haemophilus* или *Aggregatibacter* с концентрацией РФ и АЦЦП [288].

Scher и соавт., изучая микробиом полости рта выявили, что *Prevotella species* и *Leptotrichia species* были единственными характерными таксонами, которые наблюдались у пациентов с впервые возникшим РА (у 32,2 и 25,8% пациентов соответственно) независимо от статуса ПД (пародонта) и полностью отсутствовали в микробиоте полости рта группы контроля. Так же *Corynebacterium* и *Streptococcus* были недопредставлены у пациентов с РА, что в свою очередь говорит о недостаточности здоровой микробиоты у данных пациентов [289].

Xuan Zhang и соавт. в результате метагеномного исследования микробиома полости рта и кишечника представили данные о сниженном количестве *Haemophilus spp.* у пациентов с РА и отрицательной корреляции с сывороточными антителами, в то время как число *Lactobacillus salivaris* было повышено у пациентов с РА, особенно с высокой активностью заболевания [45, p. 903].

Chu и соавт. в своем недавнем систематическом обзоре выявили различия в таксоне *Faecalibacterium* в микробиоме кишечника, в то время как, в ротовой полости различались таксоны *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Prevotella* и некоторые виды *Prevotella spp.* между пациентами с ранним и поздним РА, и здоровым контролем. Так же были выявлены достоверные различия в α -разнообразии, которое было увеличено, либо не изменено в ротовом микробиоме при РА, либо отмечалось уменьшение или отсутствие изменений данного разнообразия в кишечнике [256, p. 1062-1063].

Гульнева М.Ю. и соавт. провели исследование микробиоценоза кишечника с системной красной волчанкой, склеродермией и системными васкулитами [49, с. 1-82].

В Казахстане исследования, посвященных микробиому при РА нами найдено не было.

Европейские ученые Agumagam и соавт. изучив метагеном 4 стран, предложили рассматривать микробиом с точки зрения энтеротипов [290], так бактерии ЖКТ были кластеризованы в 3 энтеротипа *Bacteroides*, *Ruminococcus* и *Prevotella* [254, с. 40; 290, p. 177]. Считается что все три энтеротипа должны присутствовать в микробиоме кишечника и характер питания, возраст, вес либо пол не имеют влияние на формирование энтеротипов [254, с. 39], но результаты

дальнейших исследований в разных популяциях были весьма противоречивы, так к примеру ученые Китая обнаружили взаимосвязь энтеротипов и характера питания, и в их выборке были представлены лишь 2 энтеротипа *Bacteroides* и *Ruminococcus* [291], Bushman и соавт. так же выделяют 2 энтеротипа и отмечают роль взаимосвязи с питанием [292], в то время как Lim и соавт. в своем исследовании на здоровой популяции корейцев представили энтеротипы *Bacteroides* и *Prevotella* [293], Li и соавт. в метагеномном исследовании энтеротипов, включавших индивидуумов китайской, казахской и уйгурской национальной принадлежности, выявили 2 энтеротипа *Bacteroides* и *Prevotella*, энтеротип *Prevotella* имел взаимосвязь с жировым обменом и чувствительностью к инсулину [294], Liang и соавт. в своем исследовании в Тайвани наряду с энтеротипами *Bacteroides* и *Prevotella*, представили новый субтип *Enterobacteriaceae* [295], ученые России в своем исследовании представили энтеротипы *Prevotella* и *Firmicutes* [254, с. 41], в Казахстане Кушугулова А.Р. и соавт. проведя метагеномное исследование в Казахстане, выделили все три энтеротипа, с преобладанием *Prevotella* в казахской популяции [296].

В связи с результатами исследований микробиома стремительно развивается новая область фармако-микробиотики, изучающая влияние изменений микробиома человека на лекарственные препараты. Фармако-микробиологические исследования показали, что кишечные микроорганизмы человека и их ферментные продукты могут влиять на биодоступность, клиническую эффективность и токсичность широкого спектра лекарств с помощью прямых и косвенных механизмов. На сегодняшний день имеются исследования прогностической значимости микробиома кишечника и возможности его использования как мишени при лечении РА [297-300]. Так же ведутся исследования о влиянии пробиотиков на микробиом кишечника при РА [301-303]. Это многообещающая область для прогнозирования реакции на лечение и для модуляции микробиома для улучшения реакции на терапию или снижения токсичности лекарств.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Нами было проведено исследование в рамках проекта грантового финансирования конкурса молодых ученых МОН РК, ИРН проекта AP08052703 «Определение микробиомных и геномных биомаркеров ревматоидного артрита в Казахстанской популяции», одобренного локальным этическим комитетом (ЛЭК) National Laboratory Astana (NLA), Назарбаев Университет, протокол №03-2019 от 05.08.2019 г. (Приложение В). Исследование в рамках докторантуры не противоречило принципам Хельсинской декларации и было одобрено ЛЭК НАО «Медицинский университет Астана», заключение ЛЭК - протокол №3 от 30.03.2022 г. (Приложение Г).

В период с сентября 2019 года по декабрь 2021 года сплошным методом производился рекрутинг пациентов состоящих на учете с диагнозом ревматоидного артрита на базе ГУ «Центральный госпиталь с поликлиникой МВД РК», ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №12», ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №10», г. Астана (Нұр-Сұлтан) в количестве 90 пациентов.

Критериями включения в исследование были:

- женский пол;
- возраст от 30 до 55 лет;
- установленный диагноз ревматоидного артрита в развернутой или поздней стадии (длительность заболевания не менее 1 года);
- уроженка Казахстана/проживание в Казахстане не менее 10 лет.

Критериями исключения были: возраст менее 30 и более 55 лет, беременность и лактация на момент включения в исследование, наличие онкологического заболевания на момент исследования, тяжелая сопутствующая соматическая патология в стадии декомпенсации, прием антибиотиков, пробиотиков, противовирусных препаратов за последние 3 месяца на момент включения в исследование, наличие верифицированных паразитозов, острого респираторного заболевания на момент исследования, резекция желудка и/или кишечника в анамнезе.

Ввиду превалирования в основной группе исследования женщин казахской этнической группы и недостаточно большого числа пациенток славянской этнической группы 8 женщин славянского происхождения были исключены из исследования. Таким образом, основную группу исследования составили пациентки женского пола, страдающие РА в возрасте 30-55 лет казахской этнической принадлежности в количестве 82 человек.

Также был произведен рекрутинг здоровых женщин с отсутствующим семейным анамнезом по РА и другим аутоиммунным заболеваниям казахской этнической принадлежности для набора контрольной группы в количестве 114 человек. Критерии исключения для контрольной группы были едины, как и для основной группы исследования.

Всем участникам исследования было предложено информированное согласие на участие в исследовании после проведенной разъяснительной беседы о целях и плане исследования (информация об исследовании, и копия информированного согласия были выданы на руки). Подписавшие информированное согласие участники были включены в исследование. Все включенные в исследование участники проходили процесс регистрации с присвоением индивидуального кода с целью соблюдения принципов конфиденциальности.

2.2 Эпидемиологический анализ

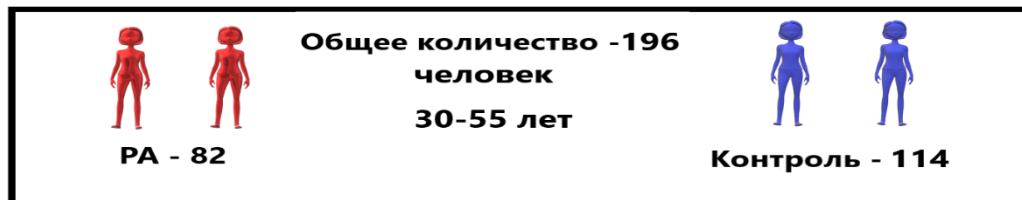
Проведен анализ статистических данных по форме 12 для сбора административных данных, предоставленных в соответствии с Кодексом Республики Казахстан "О здоровье нации и системе здравоохранения" в форме отчета о количестве заболеваний, зарегистрированных у пациентов, проживающих в зоне обслуживания медицинской организации, и контингентах пациентов, находящихся под диспансерным наблюдением. Распространенность и заболеваемость были рассчитаны в соответствии с общепринятыми правилами, согласно которому число зарегистрированных случаев РА или число впервые зарегистрированных случаев РА за отчетный период делится на среднюю численность населения и умножается на 100 000. Демографические данные по Республике Казахстан были получены с официального сайта Агентства стратегического планирования и реформ Республики Казахстан Бюро национальной статистики [304]. Стандартизированные показатели были рассчитаны с использованием метода прямой стандартизации. 95% ДИ был рассчитан с использованием метода Клоппера–Пирсона. В качестве стандарта были использованы данные за 2017 год.

2.3 Методы исследования

Ниже представлен дизайн исследования (рисунок 1), схематично демонстрирующий основные методы исследования.

Все женщины, включенные в исследование, осматривались ревматологом с соблюдением мер инфекционной безопасности в условиях эпидемии COVID-19. Данные были внесены в индивидуальные карты исследуемых пациентов.

Опрос жалоб и анамнестических данных включал в себя воздействие возможных триггеров заболевания. При сборе анамнеза жизни учитывались данные гинекологического анамнеза, наследственной отягощенности не только по ревматоидному артриту с уточнением линии родства, но и по другим заболеваниям. Наряду с этим отмечались перенесенные инфекционные заболевания, травмы и оперативные вмешательства, наличие аллергической отягощенности. В индивидуальных картах фиксировались данные о вредных привычках и профессиональной вредности, состояние жилищно-бытовых условий.



- Получение письменного информированного согласия
- Сбор жалоб, анамнеза заболевания и жизни
- Объективный осмотр
- Анкетирование (HAQ, FFQ)
- Лабораторная диагностика: ОАК; ОАМ; Б/х: Общ. белок, АЛТ, АСТ, креатинин, глюкоза, холестерин, СРБ; Белковые фракции; РФ; АЦЦП; Анти-Ro/SS-A; Анти-La/SS-B
- Забор образцов крови, слюны, кала



- Генетическое исследование
 - ✓ Выделение ДНК из образцов крови
 - ✓ ПЦР в реальном времени
- ↓
- Исследование микробиоценоза ротовой полости и кишечника
 - ✓ Выделение ДНК из образцов слюны и кала
 - ✓ Подготовка библиотек ДНК - ампликонов
 - ✓ Секвенирование 16S рРНК
- ↓
- Статистический и биоинформатический анализ данных
- ↓
- Интерпретация полученных результатов

Рисунок 1 – Дизайн исследования

При сборе анамнеза заболевания учитывались данные о дебюте заболевания, в том числе о характере поражения суставного синдрома в дебюте заболевания, возраста пациента на момент манифестации РА, длительности заболевания, субъективной связи заболевания с каким-либо эндогенным или экзогенным триггером, сроке от дебюта заболевания до постановки диагноза ревматоидного артрита.

В последующем пациентами заполнялись опросники для оценки состояния здоровья HAQ. В данном опроснике проводилась оценка способности пациента выполнять повседневные действия. Результаты опросника интерпретировались согласно набранному общему баллу: 0-1,0 – минимальное нарушение жизнедеятельности; 1,1-2,0 – умеренное нарушение жизнедеятельности; 2,1-3,0- выраженные нарушения жизнедеятельности.

Сбор клинических данных основывался на результатах объективного осмотра пациентов врачом ревматологом, а также путем сбора жалоб, анамнеза заболевания и жизни, упомянутых ранее. Физикальный осмотр проводился с определением оценки сознания, осмотром кожных покровов, видимых слизистых оболочек, пальпации периферических лимфоузлов, оценки состояния мышечной ткани, а также антропометрических данных, расчетом индекса массы тела (ИМТ) по методу А. Кетле, измерением артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД) и температуры тела. Осмотр органов и систем проводился путем пальпации, перкуссии и аускультации. Осмотр костно-суставной системы проводился согласно общепринятым правилам. Проводился расчет числа болезненных (ЧБС) и припухших (ЧПС) крупных и мелких суставов. Оценивались симптомы поперечного сжатия кистей и стоп, сила сжатия кистей. В индивидуальной карте отмечалось вовлеченность в патологический процесс проксимальных и дистальных межфаланговых суставов больших пальцев кистей и других мелких и крупных суставов с деформацией и дефигурацией. Фиксировались данные о внесуставных проявлениях заболевания и развитие осложнений. Проводилась оценка боли как пациентом, так и врачом с помощью визуальной аналоговой шкалы боли (ВАШ), анализу подвергался общий средний бал. Оценка активности заболевания проводилась согласно индексу активности заболевания DAS-28 при ревматоидном артрите [305].

Всем пациентам проводилось лабораторное исследование в клинко-диагностической лаборатории «Олимп». Забор крови осуществлялся строго натощак, после 12-14 часового периода голодания, с соблюдением мер инфекционной безопасности. Всем пациентам проводились общеклинические методы исследования с определением показателей общего анализа крови (ОАК): содержания гемоглобина, эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитарной формулы, скорость оседания эритроцитов (СОЭ) по Вестергрену; и определением показателей общего анализа мочи (ОАМ). При биохимическом исследовании крови определялись уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), общего белка, белковых фракций, креатинина, холестерина, глюкозы, С-реактивного белка (СРБ). Так же проводилось определение иммунологических показателей таких как ревматоидный фактор (РФ), антитела к циклическому цитрулинированному пептиду (АЦЦП), антитела к компонентам SS-A (Ro) и SS-B (La). Рентген стадия выставлялась согласно рентген-снимкам кистей пациенток за последний год.

Всем включенным в исследование пациентам проводился сбор слюны, кала и крови для последующего выделения ДНК, с соблюдением мер инфекционной безопасности. Были подготовлены контейнеры. Перед забором слюны все участники исследования были заранее предупреждены о необходимости воздержания от приема пищи и гигиенических процедур за 2 часа до забора материала. Забор слюны осуществлялся с помощью набора DNA/RNA Shield™ Collection Tube w/ Swab, забор кала осуществлялся с помощью набора DNA/RNA Shield™ Fecal Collection Tube, забор материала производился согласно протоколу производителя ZYMO RESEARCH USA. Забор крови, для последующего выделения ДНК, осуществлялся из вены в вакутайнеры с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Маркировка биоматериала проводилась согласно кодировке пациентов. Сбор анализа крови проводился медицинским персоналом с соблюдением мер инфекционной безопасности. Транспортировка набранных материалов производилась с соблюдением всех мер герметичности и инфекционной безопасности.

Анализ микробиоценоза и исследование единичных нуклеотидных полиморфизмов осуществлены в National Laboratory Astana, Назарбаев Университет.

Хранение вакутайнеров с образцами крови осуществлялось при -30°C . Размораживание образцов крови проводилось при комнатной температуре. Выделение ДНК из образцов крови всех участников исследования проводилось согласно требованиям Good Laboratory Practice – Надлежащей лабораторной практики. Выделение ДНК осуществлялось с помощью Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit предназначенный для выделения ДНК из крови. Проводилось определение 17 известных геномных ДНК полиморфизмов (SNP) ассоциированных с Ревматоидным артритом по данным GWAS с помощью праймеров: CD28-rs1980422, CD40-rs4810485, ETS1-rs73013527, COG6-rs9603616, CTLA4-rs3087243, FCRL3-rs2317230, HLA-DRB9-rs9268839, LBH-rs10175798, LINC01104-rs9653442, PADI2-rs761426, PADI4-rs2240340a, PTPN22-rs2476601b, RASGRP1-rs8032939, STAT4-rs11889341, SYNGR1-rs909685, TAGAP-rs2451258, TRAF1-rs3761847.

Все этапы выделения ДНК из образцов крови проводились согласно протоколу производителя (Promega Corporation 2800 Woods Hollow Road Madison, WI 53711-5399 USA) (Приложение Д).

Концентрацию ДНК в изолированных образцах определяли с использованием прибора спектрофотометр Nandorop 2000/2000c (ThermoFisher) и Qubit 2.0 с использованием набора для анализа dsDNA BR Qubit (ThermoFisher, номер по каталогу 32853). Далее проводилась оптимизация концентраций ДНК для подготовки ДНК библиотек с целью последующего проведения Real Time PCR.

В дальнейшем проводилось определение известных единичных нуклеотидных полиморфизмов ассоциированных с РА методом RT-PCR

На основе литературных данных были определены наиболее важные единичные нуклеотидные полиморфизмы ассоциированные с развитием РА

Нуклеотидные последовательности и репортерные красители указаны в таблице 1.

Таблица 1 – Нуклеотидные последовательности и использованные репортерные красители

SNP	Красители	Последовательность
HLA-DRB9- rs9268839	VIC/FAM	CGATTTATACTAAATGTAATGGGAA[A/G]CAG TTGAAGAGTCCATGACCCCAAC
CD28-rs1980422	VIC/FAM	CTATTTTGGTTTTTGACAAATTAGA[C/T]GAA ACAGGTATTATGAAAAGACTTG
CD40-rs4810485	VIC/FAM	CCTACTTTAGAGGGCTGTAGATTCC[G/T]GCC TGAAGCCTGGGCAGGAATGACC
COG6-rs9603616	VIC/FAM	ATCTCTTTAACTAAACTCAGTATTT[C/T]GCTT TCTAATCTAATTGATGGGTCA
CTLA4-rs3087243	VIC/FAM	TCTTCACCACTATTTGGGATATAAC[A/G]TGG GTAAACACAGACATAGCAGTCC
ETS1-rs73013527	VIC/FAM	GGTTCCTGGCCTAGGCGATTCCTC[C/T]GCCT CTGTGCAAGAGTCACCATGAA
FCRL3-rs2317230	VIC/FAM	CCTTCAATGTCTAGTTTATTGAGAG[G/T]TTTT AACATGAAGAGATGTTGAATT
LBH-rs10175798	VIC/FAM	CTTATGTACGCAAATGAGTTTCACC[A/G]AAA AATTGGCTAGAAACTTCCCTTC
LINC01104- rs9653442	VIC/FAM	CTTCTTCCTTGGCTGTCACCTATTT[C/T]TAAA CTGATATGTAATAGTTGTACA
PADI2-rs761426	VIC/FAM	TGTCACTTGCAACAATCCAGCCCAG[A/T]TTC CCCAGAGACAAAGCCAGGGGCT
PADI4-rs2240340	VIC/FAM	GACCCTCACCAACCTCTCCTCTTAC[C/T]TGAT GGGATTCAGAAATCTCCTTG
PTPN22- rs2476601	VIC/FAM	ACCACAATAAATGATTCAGGTGTCC[A/G]TAC AGGAAGTGGAGGGGGGATTTCA
RASGRP1- rs8032939	VIC/FAM	AAGCTACAGGCAATACTACAGTACA[C/T]GGT ACAGTCAGGGCCTAGAGGGAGG
STAT4- rs11889341	VIC/FAM	AATAACATTTACTGAACATCTTATT[C/T]TTTT ACCACTGCTCTGCTGGGCCAG
SYNGR1- rs909685	VIC/FAM	GAAGCCACTGGCTTTGTGAGGGGGC[A/T]TGT CTGCTTGGGTCATTTCTGCCTC
TAGAP- rs2451258	VIC/FAM	TCCATCCATGTTTGACCCTAATGTG[C/T]CTTT CCTGGCCTTCATGAGTTTTCG
TRAF1-rs3761847	VIC/FAM	TCTGTGGGTCCCTTCTCTCCCCTCC[A/G]GCCT CAATACCACCCTCTCTACCTG

RT-PCR проводилась с использованием технологии TaqMan в соответствии с инструкциями производителя (Applied Biosystems 7500, Foster City, CA) (Приложение E).

С целью оценки микробиома полости рта и кишечника было проведено выделение ДНК и определение качественных и количественных показателей. Из образцов слюны и кала всех участников исследования было выделено ДНК, для последующего секвенирования по локусу 16S V1-V3 на платформе NovoSeq (Illumina) и анализа микробиома ротовой полости и кишечника. Все

мероприятия по исследованию микробиома ротовой полости и кишечника проводились при условии соблюдения требований надлежащей лабораторной практики (GLP).

Образцы слюны хранились в специализированных свабах, образцы кала в специализированных пробирках (таблица 2) в холодильнике при температуре +4, согласно рекомендациям производителя ZYMO RESEARCH USA.

Таблица 2 – Данные свабов и пробирок для забора биоматериала

Образец	Количество	Упаковка
Слюна	1 мл	DNA/RNA Shield™ Collection Tube w/ Swab (ZYMO RESEARCH USA)
Кал	10 мл	DNA/RNA Shield™ Collection Tube (ZYMO RESEARCH USA)

ДНК выделяли из образцов слюны и кала с использованием набора ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit, Cat# D4301. Концентрацию ДНК в изолированных образцах определяли с использованием прибора спектрофотометр Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher) и Qubit 2.0 с использованием набора для анализа dsDNA BR Qubit (ThermoFisher, номер по каталогу 32853). Пробоподготовка образцов производилась с использованием набора NEXTflex® 16S V1-V3 Amplicon-Seq Kit (NOVA-4202-04). Далее, ампликоны секвенировали на приборе MiSeq (Illumina).

Все этапы выделения ДНК из образцов слюны и кала проводились согласно протоколу производителя (Zymo Research 17062 Murphy Ave. Irvine, CA 92614, U.S.A.) (Приложение Ж). Этапы подготовки ДНК-ампликонов представлены в разделе приложений (Приложение И).

Отфильтрованное ДНК хранилось при температуре при 2-8°C, согласно протоколу. Определение количества и качества выделенной ДНК проводилось на приборе Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher).

2.4 Статистические методы обработки данных исследования

Статистическая обработка данных проводилась согласно общепринятым требованиям на основании статистического пакета IBM Statistics 26 версия и RStudio версия 1.4.1717.

В Microsoft Excel была создана база данных и импортирована в необходимую статистическую программу. Данные исследования включали в себя как количественные, так и качественные признаки.

Нормальность распределения количественных признаков, таких как: возраст, пол, длительность заболевания, лабораторных показателей, иммунологических показателей определялись с помощью описательной статистики, путем сравнения значений средних арифметических с медианой, уровнем ассиметрии и эксцесса; графическим методом, с помощью построения гистограмм и квантильных диаграмм (Q-Q plots), а также при вычислении критерия Колмогорова-Смирнова, предназначенного для небольших выборок объемом до 5000 наблюдений.

При описании качественных данных, для расчета доверительного интервала для частот использовалась программа Confidence Intervals Analysis. Сравнение долей и частот проводилось с использованием критерия Хи квадрат Пирсона, согласно четырехпольным таблицам, с расчетом отношения шансов.

Для определения корреляционной взаимосвязи между переменными, ввиду отсутствия условий для применения коэффициента корреляции Пирсона, а именно отсутствие гомоскедастичности, выявленного путем построения скатерограммы, а также наличие переменных не подлежащих нормальному распределению, было отдано предпочтение непараметрическим коэффициентам корреляции Спирмена. Сила корреляционной взаимосвязи оценивалась согласно градации Чеддока, где 0,1-0,3 соответствовало слабой, 0,3-0,5 умеренной, 0,5-0,7 заметной, 0,7-0,9 высокой и 0,9-1,0 весьма высокой корреляционной силе.

Исследование генетических маркеров РА в исследуемой выборке осуществлялось с помощью программы RStudio Version 1.4.1717. Сравнение распределения генотипов и частоты аллелей между пациентами с РА и здоровыми контрольными группами оценивалось с помощью критерия Хи-квадрат (χ^2) с использованием отношения шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (95% ДИ). Сравнение клинических и лабораторных показателей с различными генотипами проводилось с использованием t-теста и теста χ^2 с коррекцией Yate`s при необходимости. В анализ были включены генотипы пациентов и контроля не имевшие отклонения от равновесия Харди–Вайнберга ($PNEIDI > 0.05$). Информационный критерий Акайке (AIC) использовался для выбора модели. Значение p ниже 0,05 считалось статистически значимым.

Секвенирование проводилось на платформе NovoSeq (Illumina, California, United States of America) по протоколу metagenome и с использованием соответствующей химии. Проводился биоинформатический анализ, включавший демультимплексирование, фильтрацию, удаление шумов, химерных последовательностей, определение OTU, таксономическая идентификация выполнена с использованием конвейера LotuS. В общей сложности при анализе микробиома ротовой полости было проанализировано 15616320 таксономических маркерных тегов, из которых после демультимплексирования, фильтрации, удаления шумов, химерных последовательностей, осталось 12968937. Последовательности были сгруппированы в 2785 OTU. При анализе микробиома кишечника проанализировано 16796296 таксономических маркерных тегов, после демультимплексирования, фильтрации, удаления шумов, химерных последовательностей, осталось 14378311. Далее последовательности были сгруппированы в 3681 OTU.

Для таксономической идентификации последовательности ампликоны сравнивались с базой SILVA. Анализ альфа-разнообразия для оценки численности сообщества, подсчет альфа-биоразнообразия (индекс Шеннона), бета-биоразнообразия, а также построение таксономического распределения на уровне типов и родов выполняется с использованием пакетов Vegan и Phyloseq

R (v.1.24.2), графики генерируются с использованием веб-платформы для всестороннего анализа – MicrobiomeAnalyst.

Непараметрические критерии Манна-Уитни (MW) и Краскела-Уоллиса (KW) использовались при сравнении двух или более групп. Подход к обнаружению метагеномных биомаркеров, линейный дискриминантный анализ Effect Size (LEfSe), использовался для идентификации микробных компонентов, чьи последовательности статистически различаются между группами. Проводился линейный дискриминантный анализ (LDA) для оценки размера эффекта каждого дифференциально обильного таксона. Бактерии с заметно увеличенными числами определялись как бактерии с LDA-баллом (\log_{10}) более 2. Для прогнозирования форм РА использовались MaAsLin 2-многомерные ассоциации микробиома с линейными моделями.

Выражаем огромную признательность за постоянную помощь при выполнении биоинформатического анализа сотрудникам National Laboratory Astana, Назарбаев Университет: Кожахметову С.С., Бабенко Д.Б., Жеткенову С.А..

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Эпидемиологические данные ревматоидного артрита в Казахстане

Нами была проанализирована эпидемиология РА в Казахстане. Так как абсолютная численность населения Казахстана увеличилась за 2017-2019 гг. число пациентов с РА продемонстрировало ту же общую тенденцию, хотя общие показатели распространенности и заболеваемости продемонстрировали тенденцию к снижению в 2018 году, как показано в таблице 3.

Таблица 3 – Распространенность и заболеваемость РА в Республике Казахстан в 2017-2019 гг.

Распространенность					
год	колич. зарегистрированных случаев РА	население	абс. число на 100 000	доля в (%)	стандартизованный показатель (95% ДИ)‡
2017	68 618	18 157 337	377,9	0,38	376,4 (373,6–379,2)
2018	66 647	18 395 567	362,2	0,36	374,5 (371,7–377,3)
2019	71 266	18 631 779	382,5	0,38	382,8 (379,9–385,6)
Заболеваемость					
2017	15 386	18 157 337	84,7	0,085	84,7 (83,4–86,1)
2018	15 498	18 395 567	84,2	0,084	84,3 (82,9–85,6)
2019	16 146	18 631 779	86,7	0,087	86,7 (85,4–88,1)

Средняя распространенность РА в Казахстане в 2017-2019 гг. составляла 0,36–0,38%, а заболеваемость составляла 0,085–0,087% (таблица 3). Самые высокие показатели РА наблюдались в возрастной группе 60 лет и старше, за которой следовала возрастная группа 18-59 лет. Следует отметить, что крупнейшая доля населения Республики Казахстан относится к возрастной группе 18-59 лет (таблица 4).

Таблица 4 – Распространенность РА на 100 тыс. населения в 2017-2019 гг. в зависимости от возраста и пола

Годы	Возрастная группа			
	18-59		60 лет и старше	
	мужчины	женщины	мужчины	женщины
2017	270	1003	789	1183
2018	264	956	812	1202
2019	304	1005	902	1218

При проведенном нами анализе в возрастной группе 60 лет и старше в течение исследуемого периода наблюдался значительный рост заболеваемости РА среди мужчин, хотя у женщин по-прежнему наблюдалась более высокая

распространенность, при этом соотношение женщин и мужчин в 2019 году составляло 1,3:1. В возрастной группе 18-59 лет РА преобладал у женщин с соотношением женщин и мужчин 3:1. В 2018 году наблюдалось снижение распространенности РА как у женщин, так и у мужчин в возрастной категории 18-59 лет, хотя в 2019 году распространенность РА увеличилась среди взрослого населения Республики Казахстан (таблица 5).

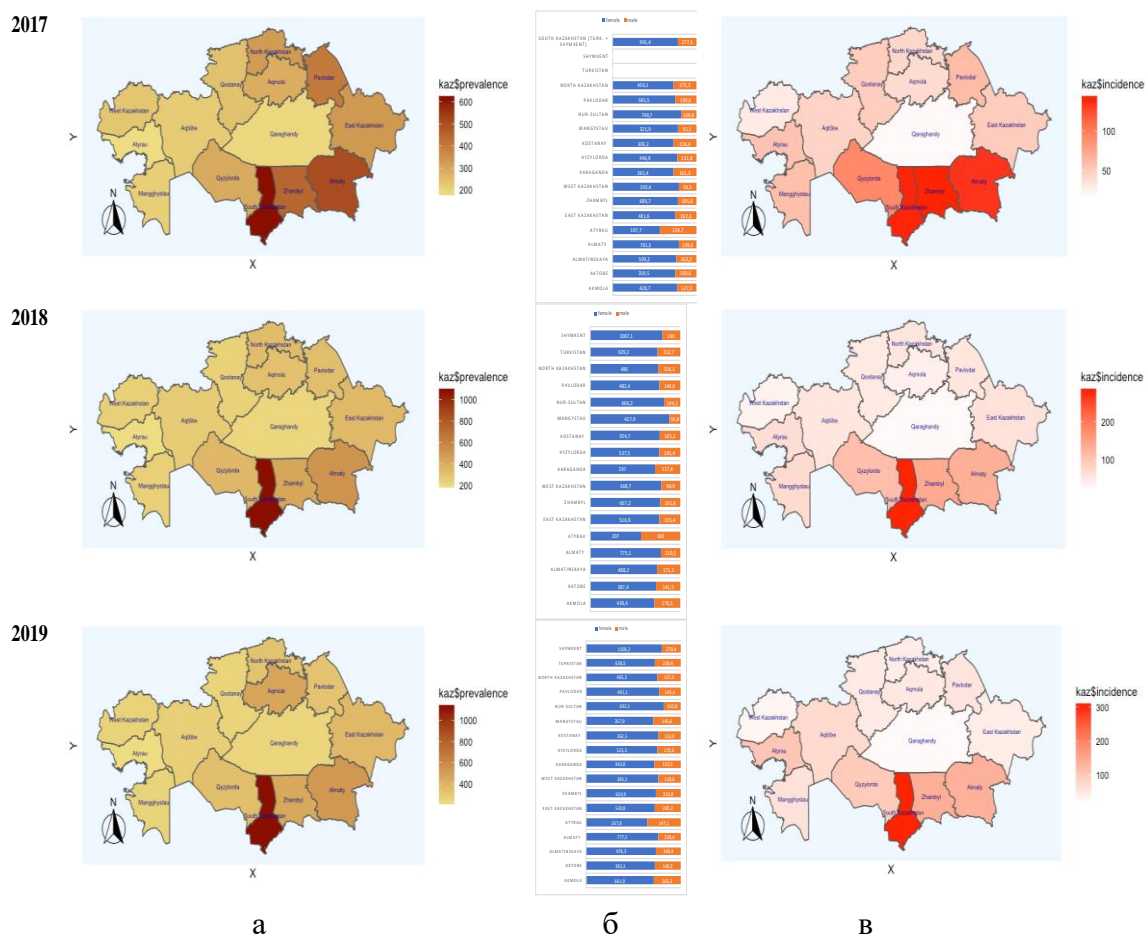
С 2017 по 2019 год было отмечено увеличение абсолютного числа случаев РА среди женщин всех возрастов, хотя в 2018 году наблюдалось снижение общей распространенности и общей заболеваемости среди женщин (таблица 5).

Таблица 5 – Распространенность и заболеваемость РА в 2017-2019 гг. в зависимости от пола

Распространенность среди женщин					Заболеваемость среди женщин			
годы	количество зарегистрированных случаев РА	население	абс. число на 100 000	доля в %	количество зарегистрированных случаев РА	население	абс. число на 100 000	доля в %
2017	53 455	9 366 039	571	0,57	11 417	9 366 039	121,9	0,122
2018	51 846	9 482 371	547	0,55	11 468	9 482 371	120,9	0,121
2019	54 275	9 597 645	566	0,57	11 860	9 597 645	123,6	0,124
Распространенность среди мужчин					Заболеваемость среди мужчин			
2017	15 163	8 791 298	172,5	0,173	3 969	8 791 298	45,1	0,045
2018	14 801	8 913 196	166,1	0,167	4 030	8 913 196	45,2	0,045
2019	16 991	9 034 134	188,1	0,188	4 286	9 034 134	47,4	0,047

Распространенность РА среди мужчин снизилась в 2018 году до 0,17% населения, затем увеличилась в 2019 году и составила 0,19% населения (таблица 5). В то время как заболеваемость среди мужчин увеличилась за анализируемый период, в среднем соотношение распространенности РА среди женщин и мужчин составляло 3:1.

Далее проведен анализ распространенности и заболеваемости РА по географическим регионам (рисунок 2; таблицы 6, 7).



а – Prevalence of RA by regions of Kazakhstan in 2017-2019 (распространенность РА по регионам Казахстана в 2017-2019 гг.); б – Gender Differences in the Prevalence (гендерные различия в распространенности); в – Incidence of RA by regions of Kazakhstan in 2017-2019 (заболеваемость РА по регионам Казахстана в 2017-2019 гг.)

Рисунок 2 – Распространенность и заболеваемость РА по регионам Казахстана в 2017-2019 гг.

Таблица 6 – Распространенность РА по регионам Казахстана в 2017-2019 гг.

Распространенность РА на 100 000 населения									
Регион	2017 год			2018 год			2019 год		
	всего	жен.	муж.	всего	жен.	муж.	всего	жен.	муж.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Акмола	282,6	428,7	127,3	311,8	439,4	176,5	469,3	661,9	265,3
Актобе	217,9	319,5	109,6	268,3	387,4	141,5	274,9	393,3	149,2
Алиатинская	338,0	509,2	163,2	331,1	488,2	171,2	325,1	478,3	168,4
Алматы	505,2	761,5	199,9	517,2	775,1	210,5	530,1	777,5	238,4
Атырау	176,6	197,7	154,7	183,8	207,0	160,0	208,3	267,8	147,1
Восточный Казахстан	329,4	481,6	162,3	344,4	516,9	155,4	372,9	530,8	200,2
Жамбыл	446,6	689,7	195,6	433,0	667,2	191,6	448,3	654,9	235,8
Западный Казахстан	225,9	350,4	93,5	238,0	368,7	98,9	255,8	385,1	118,6
Караганда	187,6	265,4	101,3	211,7	297,0	117,4	243,9	343,8	133,5

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Кызылорда	289,1	446,9	131,8	350,9	537,5	165,4	347,3	525,3	170,6
Костанай	238,3	339,2	126,4	236,2	354,7	105,2	244,4	362,5	113,9
Мангыстау	207,5	321,9	92,1	243,0	427,9	56,8	252,1	357,9	145,6
Нур-Султан	470,1	749,7	168,8	415,6	666,2	144,1	432,3	692,1	150,8
Павлодар	403,12	585,5	199,6	323,4	482,4	146,6	327,3	491,1	145,4
Северный Казахстан	323,5	459,1	175,3	328,2	486,0	156,1	327,3	483,2	157,3
Туркистан	-	-	-	418,0	629,2	212,7	435,6	638,5	238,4
Шымкент	-	-	-	682,0	1067,1	265,0	708,7	1108,2	279,4
ЮКО (Туркистан + Шымкент)	625,9	991,4	277,1	-	-	-	-	-	-

Таблица 7 – Заболеваемость РА по регионам Казахстана в 2017-2019 гг.

Заболеваемость РА на 100 000 населения									
Регион	2017 год			2018 год			2019 год		
	всего	жен.	муж.	всего	жен.	муж.	всего	жен.	муж.
Акмола	38,7	54,4	22,1	39,7	48,1	30,7	51,2	59,4	42,5
Актобе	45,0	48,4	41,4	54,7	67,8	40,8	72,8	99,1	44,9
Алматинская	87,5	121,3	52,9	87,3	114,6	59,5	85,7	112,3	58,4
Алматы	134,3	196,1	60,8	128,9	190,7	55,3	133,8	188,6	69,2
Атырау	55,3	82,2	27,4	63,9	88,4	38,7	103,8	176,7	28,9
Восточный Казахстан	48,9	69,9	26,1	58,0	82,3	31,5	44,7	63,6	24,0
Жамбыл	143,8	207,7	77,9	136,7	193,8	77,9	138,2	207,2	67,3
Западный Казахстан	28,8	40,8	15,9	36,2	53,9	17,4	32,7	44,1	20,7
Караганда	18,8	23,7	13,3	26,0	33,7	17,4	24,8	26,4	22,9
Кызылорда	92,9	141,2	44,9	107,8	160,1	55,7	96,4	138,1	55,1
Костанай	48,4	66,7	28,2	48,6	69,1	25,8	48,2	63,4	31,5
Мангыстау	57,9	89,3	26,1	69,4	117,5	21,0	59,8	78,4	41,1
Нур-Султан	111,3	170,6	47,4	105,4	161,0	45,2	101,4	150,6	48,1
Павлодар	59,6	81,7	35,0	53,3	76,3	27,7	56,8	76,8	34,5
Северный Казахстан	41,7	57,3	24,7	52,7	74,3	29,0	44,5	62,2	25,1
Туркистан	-	-	-	76,7	107,3	46,9	76,5	108,3	45,6
Шымкент	-	-	-	209,9	229,0	96,3	233,5	360,2	97,3
ЮКО (Туркистан + Шымкент)	139,6	205,7	72,9	-	-	-	-	-	-

При анализе распространенности и заболеваемости РА по географическим регионам, наибольшее количество зарегистрированных случаев РА было отмечено, в том числе среди женщин, в Шымкентской области. Наименьшее количество случаев было зарегистрировано в Атырауской

области. В течение исследуемого периода в Акмолинской области наблюдалось значительное увеличение числа зарегистрированных случаев заболевания, в то время как в Павлодарской и Северо-Казахстанской областях за исследуемый период наблюдалось небольшое снижение числа случаев РА (рисунок 2). В южных регионах страны наблюдалась более высокая распространенность РА по сравнению с северными регионами. С точки зрения заболеваемости Шымкент также имел самую высокую долю, а самая низкая доля заболеваемости была отмечена в Карагандинской области.

Таким образом распространенность РА в Казахстане в 2017-2019 гг. составила 0,36-0,38%, заболеваемость 0,085-0,087%, соотношение женщин к мужчинам 3:1, южные регионы Казахстана имели более высокую распространённость и заболеваемость РА. Данные представленные в этой главе опубликованы [24, р. 750-755].

3.2 Изучение особенностей клинического течения ревматоидного артрита

Нами был проведен сравнительный анализ исследуемых групп. Возраст исследуемых женщин не имел статистически значимых различий Me возраста основной группы женщин, страдающих РА, составила 46,5 лет (Q1-Q3: 38-50,7), в то время как в контрольной группе был равен 44 (Q1-Q3: 36-49). Все исследованные женщины основной и контрольной группы были казахской этнической принадлежности. Анамнестические данные участниц исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Сравнительный анализ социального статуса основной и контрольной группы исследования

Признак	Основная N=82		Контрольная N=114		Уровень значимости, p
	n/%	95% ДИ	n/%	95% ДИ	
Семейное положение, замужем	61/74,4	64-82,6	77/67,5	58,5-75,4	0,300
Наличие образования	48/58,5	47,7-68,6	91/79,8	71,5-86,2	$\chi^2=10,480$ df=1 p=0,001* ОШ=0,357 (0,189-0,673)
Трудоустройство	52/64,3	52,6-73	94/82,5	74,4-88,3	$\chi^2=9,1$ df=1, p=0,003*, ОШ=0,369 (0,191-0,713)
Профессиональная вредность	10/12,2	6,8-21	28/24,6	17,6-33,2	$\chi^2=4,677$ df=1, p=0,031* ОШ=0,427 (0,194-0,937)
Условия проживания, квартира	58/70,7	60,1-79,5	100/87,78	80,4-92,5	$\chi^2=8,806$ df=1, p=0,003*, ОШ=0,338 (0,162-0,705)
Условия проживания, частный дом	24/29,3	20,5-39,9	14/12,3	7,5-19,6	
* – статистически значимый результат					

Полученные результаты отражают наличие статистически значимых различий по уровню образования исследуемых женщин, следует отметить, что женщины страдающие РА сравнительно чаще имели более низкий уровень образования, наряду с этим доля трудоустроенных лиц в этой группе так же была достоверно снижена, однако данный показатель отчасти обусловлен тяжестью самого заболевания и развившегося на его фоне ограничения трудоспособности. Изучая наличие профессиональной вредности среди исследуемых лиц нами, было выявлено, что в основной группе исследования наличие профессиональной вредности было достоверно ниже, что позволяет нам исключить данный фактор как провоцирующий фактор РА. Социально-бытовые условия среди исследуемых лиц статистически различались: женщин, проживающих в частных домах, сравнительно больше в основной группе, что сопряжено с дополнительной нагрузкой по бытовой деятельности.

Изучая анамнестические данные исследуемых женщин по наследственной отягощенности, было выявлено, что в основной группе исследования не преобладала наследственная отягощенность по таким заболеваниям как артериальная гипертензия (АГ), сахарный диабет (СД), бронхиальная астма (БА), однако, среди женщин группы контроля доля наследственной отягощенности по СД была достоверно выше. Так же среди данных лиц с большей частотой была вредная привычка в виде употребления алкоголя (таблица 9).

Таблица 9 – Анализ анамнестических данных основной и контрольной группы исследования

Признак	Основная N=82		Контрольная N=114		Уровень значимости, p
	n/%	95% ДИ	n/%	95% ДИ	
Курение	4/4,9	1,9-11,9	7/6,1	3,0-12,1	0,705
Алкоголь	2/2,4	0,7-8,5	21/18,4	12,4-26,5	$\chi^2=11,762$, df=1, p=0,001* ОШ=0,111 (0,025-0,487)
Наследственность по АГ	38/46,3	36,0-81,1	50/43,9	35,1-53	0,730
Наследственность по СД	10/12,2	6,8-21	31/27,2	19,9-36,0	$\chi^2=6,485$ df=1 p=0,011* ОШ=0,372 (0,171-0,811)
Наследственность по БА	4/4,9	1,9-11,9	2/1,8	0,5-6,2	0,210
Наследственность по онкозаболевания	3/3,7	1,3-10,2	6/5,3	2,4-11,0	0,596
Аллергия	36/43,9	33,7-54,7	47/41,2	32,6-50,4	0,709
Травмы	28/34,1	24,8-44,9	28/24,6	17,6-33,2	0,943
Операции	59/72	61,4-80,5	47/41,2	32,6-50,4	0,720
Гемотрансфузии	15/18,3	11,4-28	18/15,9	10,2-23,6	0,664
Вак-я за последние 10 лет	26/31,7	22,6-42,4	43/37,7	29,4-46,9	0,385
* – статистически значимый результат					

Так же нами был проведен сравнительный анализ данных гинекологического анамнеза участников исследования, который представлен в таблице 10.

Таблица 10 – Анализ гинекологического анамнеза основной и контрольной группы исследования

Признак	Основная N=82		Контрольная N=114		Уровень значимости, p
	n/% Me	95% ДИ Q1-Q3	n/% Me	95% ДИ Q1-Q3	
Количество беременностей в анамнезе	3	2-4	4	3-5	0,743
Количество родов	2	1-3	2	2-3	0,945
Длит корм грудью, мес.	12,5	7,75-20	17	12-20	U= 2891 Z= -2,093 p=0,036*
Аборт в анамнезе	32/39	29,2-49,8	45/39,5	31-48,6	0,949
Выкидыши в анамнезе	12/14,6	8,6-23,9	26/22,8	16,1-31,3	0,153
Замершие берем в анамнезе	11/13,4	7,7-22,4	17/14,9	9,5-22,6	0,768
Конрацепция, КОКами	0		4/3,5	1,4-8,7	0,087
* – статистически значимый результат					

Безусловно обращает на себя внимание более длительный период грудного вскармливания среди женщин контрольной группы.

Далее нами были оценены инфекционные факторы из анамнеза жизни лиц основной и контрольной групп исследования, которые представлены в таблице 11, где не выявлено статистически значимых различий.

Таблица 11 – Анализ инфекционных факторов основной и контрольной группы исследования

Признак	Основная N=82		Контрольная N=114		Уровень значимости, p
	n/%	95% ДИ	n/%	95% ДИ	
Эбштейн-Барр	0	-	2/1,8	0,5-6,2	0,228
ЦМВ	9/11	5,9-19,6	10/11,5	4,8-15,4	0,607
Герпес	21/25,6	17,4-36	24/21,1	14,6-29,4	0,454
Хеликобактер Пилори	15/18,3	11,4-28	16/14	8,8-21,6	0,420
Туберкулез	4/4,9	1,9-11,9	3/2,6	0,9-7,5	0,403
Гепатит А	14/17,1	10,5-26,6	22/19,3	13,1-27,5	0,691
Гепатит В	0	-	1/0,9	0,2-4,8	0,395
Корь	7/8,5	4,2-16,6	10/8,8	4,8-15,4	0,954
Краснуха	7/8,5	4,2-16,6	16/14	8,8-21,6	0,238
Ветрянка	39/47,6	37,1-58,2	62/54,4	45,2-63,2	0,346
Онкология в анамнезе	1/1,2	0,2-6,6	1/0,9	0,2-4,8	0,814
COVID19	28/34,1	24,8-44,9	51/44,7	35,9-53,9	0,136

Так же производился сбор анамнеза половых инфекций, но ввиду того, что женщины контрольной группы указывали на отсутствие перенесенных половых инфекций, сравнительный анализ не представился возможным.

Проведенный объективный осмотр безусловно показал наличие статистически значимых различий по суставному поражению, поэтому более подробное описание результатов объективного осмотра будет представлено ниже. Сравнение антропометрических данных основной и контрольной групп исследования показало отсутствие статистически значимых различий и представлено в таблице 12, где обращает на себя внимание лишь статистически значимые различия по уровню диастолического артериального давления (ДАД), что вероятно обусловлено приемом лекарственных препаратов, либо течением основного заболевания среди женщин страдающих РА.

Таблица 12 – Анализ антропометрических данных основной и контрольной группы исследования

Признак	Основная N=82		Контрольная N=114		Уровень значимости, p
	Me	Q1-Q3	Me	Q1-Q3	
Вес, кг	65,0	57,0-71,0	66,7	58-74	0,121
Рост, см	160	156-165	161	158-165	0,497
ИМТ, кг/м ²	24,5	21,6-28,6	25,5	22,6-28,4	0,357
САД	119	110-128	115	110-125	0,165
ДАД	74	70-81	70	64,7-78	U=3530 Z=-2.927 p=0,003*
Пульс	73	66-80	72,5	67-80	0,571
температура	36,3	36,2-36,5	36,4	36,3-36,5	0,211
ЧДД	18	16-18	17	16-18	0,303
* – статистически значимый результат					

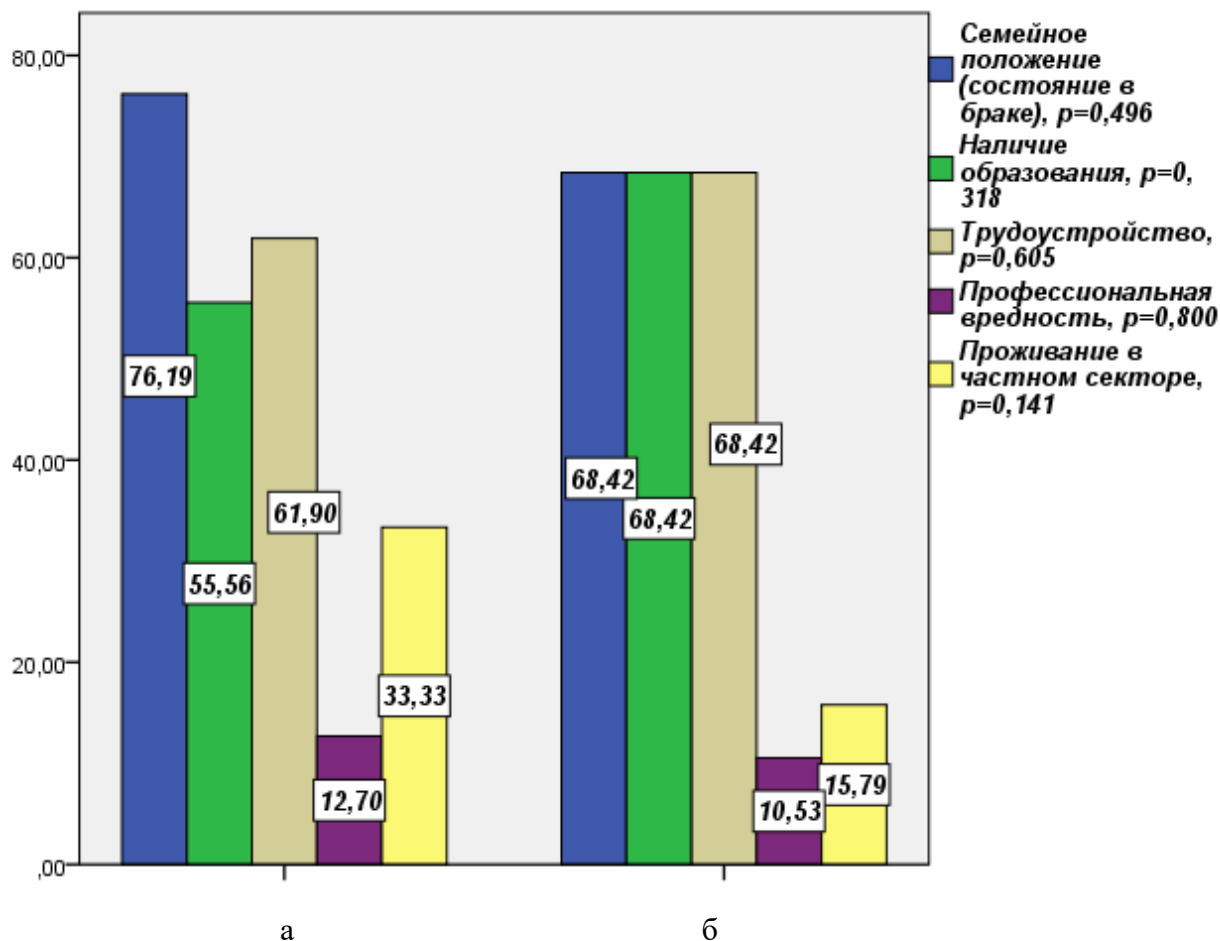
Таким образом, при сравнении основной и контрольной групп исследования были выявлены статистически значимые различия в уровне образованности, трудоустройстве, наличии профессиональной вредности, условиях проживания, наследственности, употребления алкоголя, длительности кормления грудью и ДАД.

3.2.1 Клинико-anamnestические характеристики исследуемых женщин в зависимости от РФ-статуса

В дальнейшем нами был проведен более подробный сравнительный анализ основной группы исследования по клиническим данным, учитывая иммунологический статус при проведении сравнительного анализа пациентки были подразделены на 2 подгруппы в зависимости от серологического статуса, таким образом первую подгруппу составили РФ-позитивные пациентки в количестве 63 человек, вторую подгруппу составили 19 человек с РФ-негативным статусом. При проведении сравнительного анализа возраста

женщин с разным РФ статусом не было выявлено статистически значимых различий ($p = 0,587$), Ме возраста в обеих группах составила 44 года (Q1-Q3: 36–50) и 47 лет (Q1-Q3:38-50), соответственно.

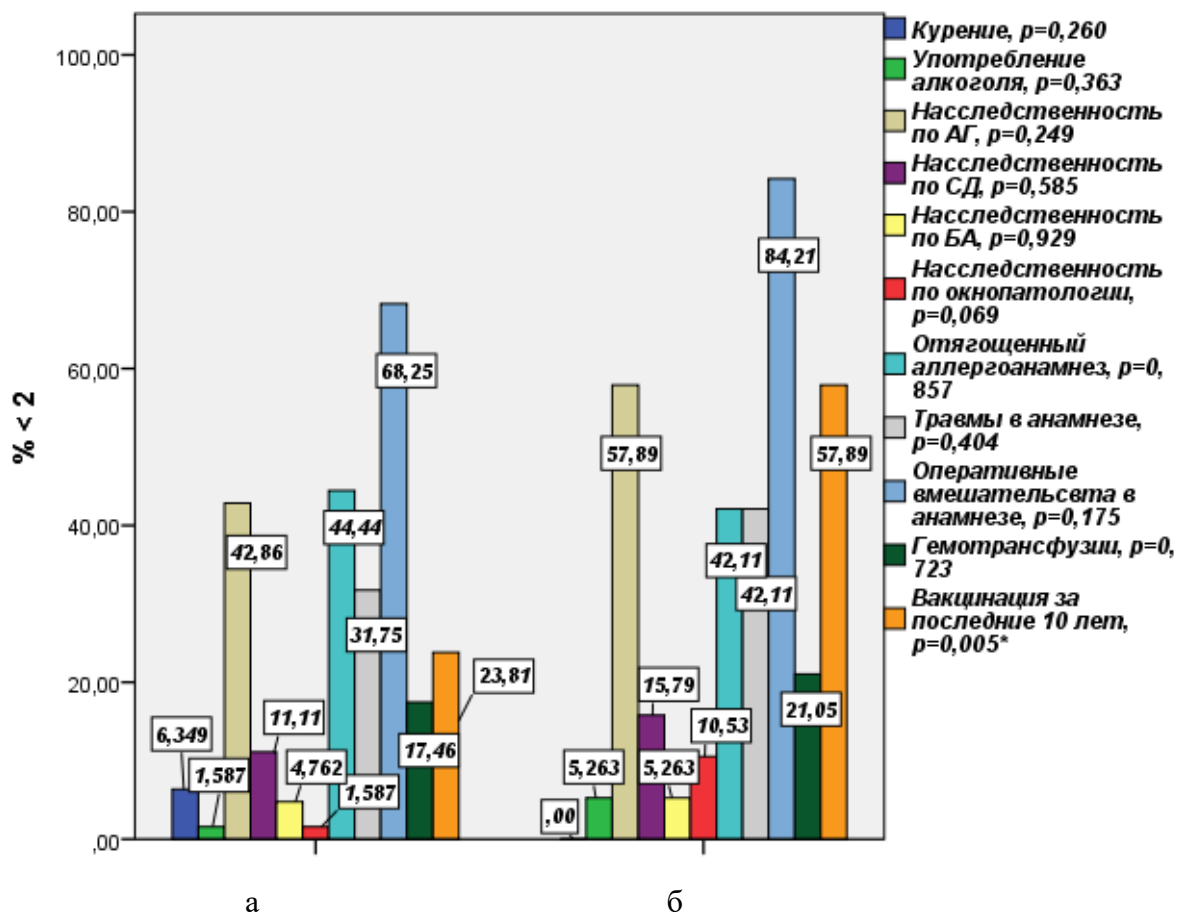
Анализируя социальный статус по таким показателям, как семейное положение, наличие образования, наличие профессиональной вредности, условия проживания в исследуемых подгруппах не было выявлено статистически значимых различий (рисунок 3). Однако обращало на себя внимание, что доля лиц, проживающих в частном секторе, преобладала среди женщин с РФ-позитивной формой РА.



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 3 – Анализ социального статуса в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

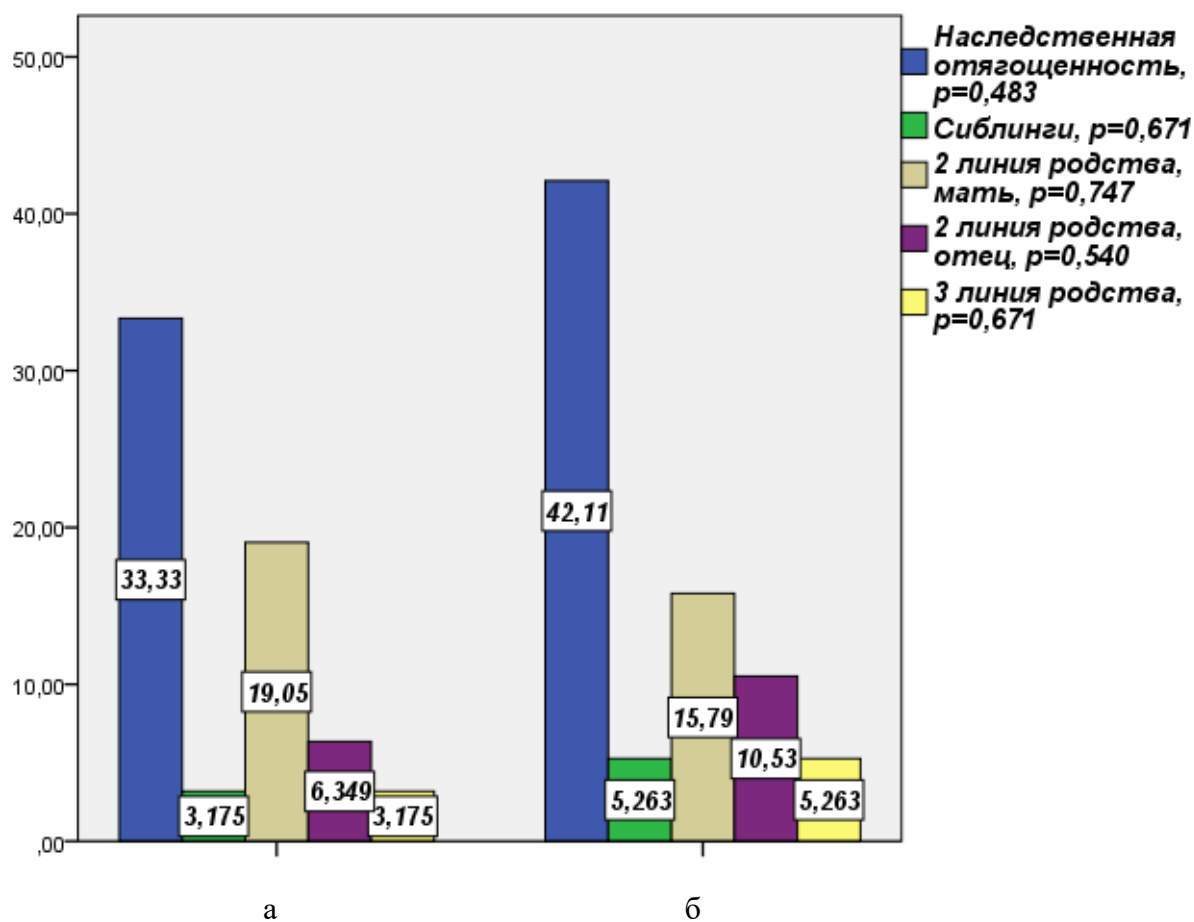
Изучая анамнестические данные женщин, страдающих РА, достоверных различий в частоте вредных привычек, наследственной отягощенности по различным заболеваниям, по травмам, оперативным вмешательствам и произведенным в анамнезе гемотранфузиям выявлено не было. Однако, нами была выявлена достоверная разница в частоте вакцинаций за последние 10 лет, которая достоверно чаще была среди женщин с РФ-негативным РА, $\chi^2=7,832$, $df=1$, $p=0,05$, ОШ=0,227(95%ДИ: 0,077-0,669), (рисунок 4).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 4 – Анализ анамнестических данных в исследуемых подгруппах с РФ-положительной и РФ-негативной формой заболевания

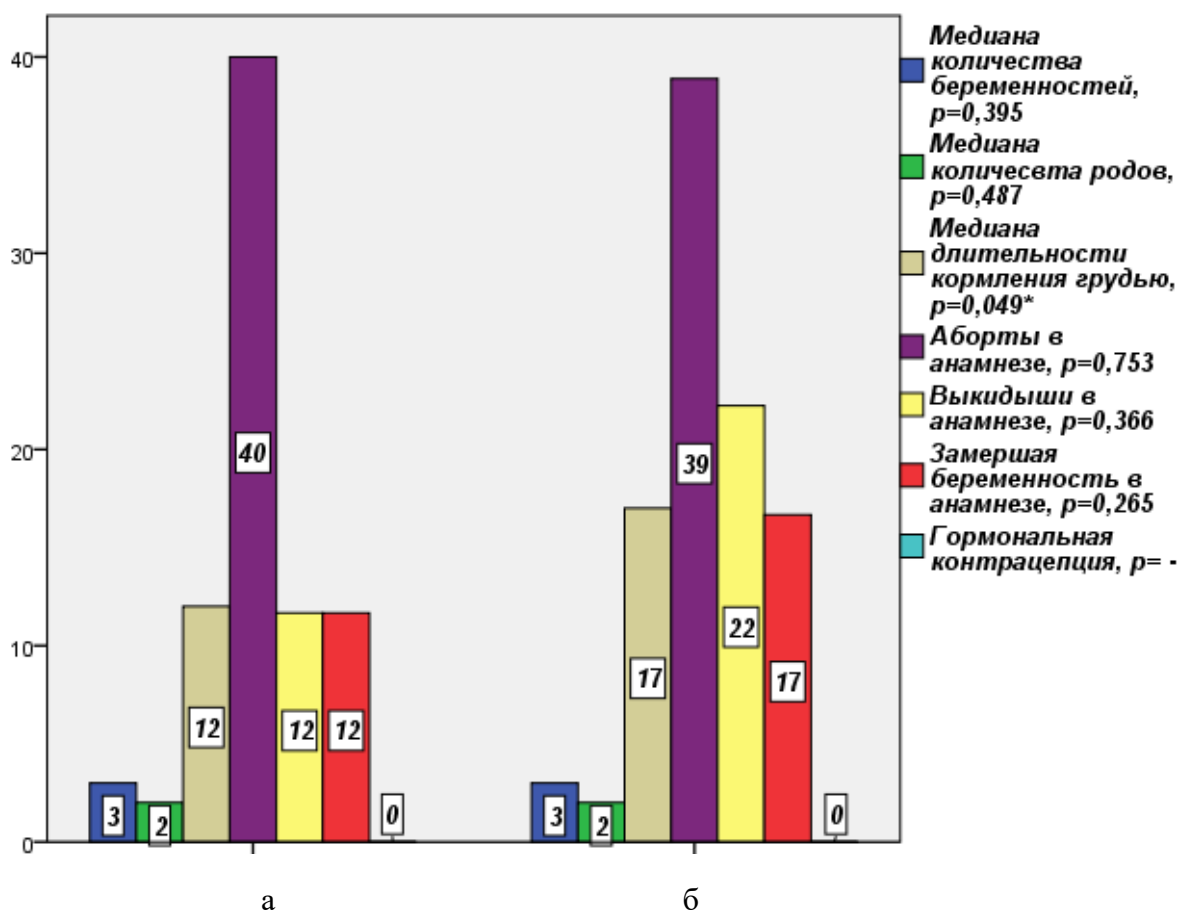
Изучая наследственную отягощенность по РА, нами так же не было выявлено статистически значимых различий ни в самой наследственности в целом, ни по линиям родства по отдельности (рисунок 5).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 5 – Анализ наследственной отягощенности по РА в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

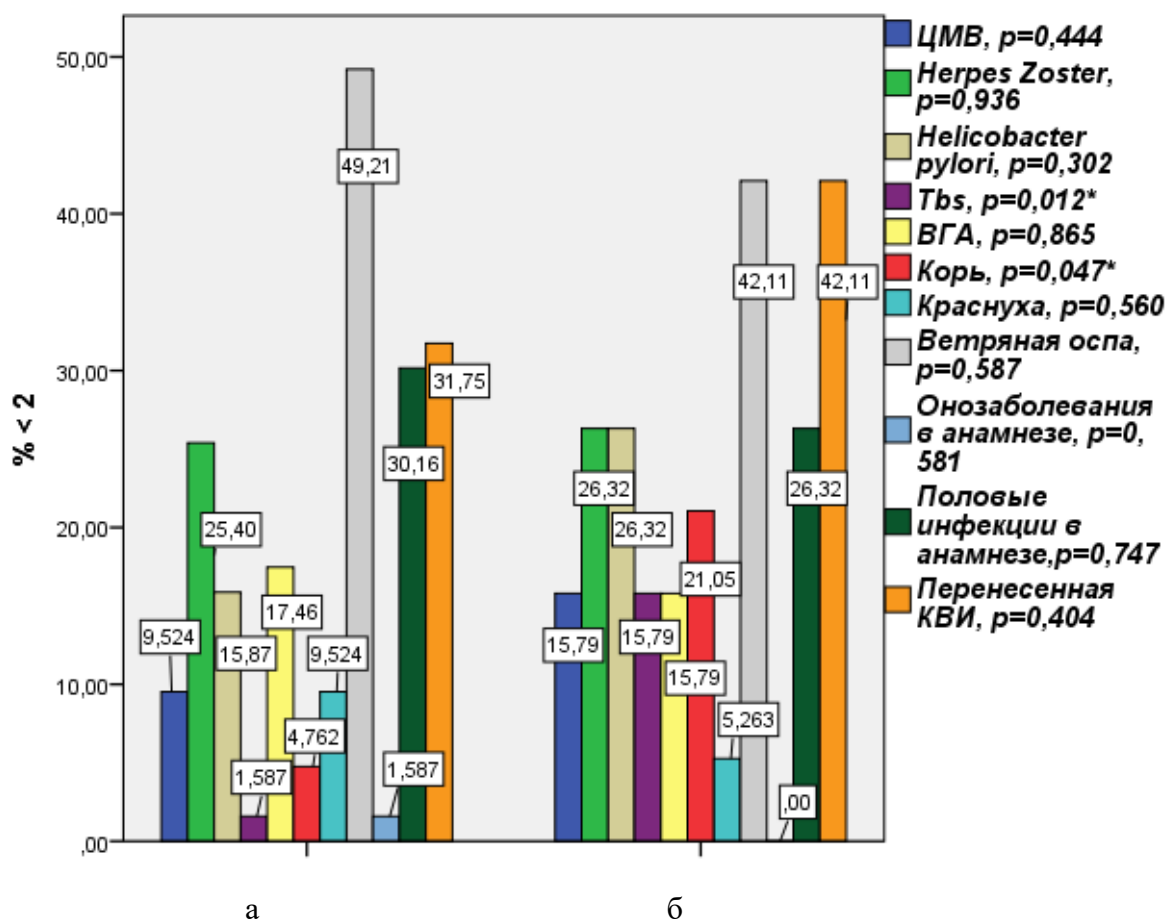
При анализе гинекологического анамнеза среди исследуемых женщин страдающих РА, было выявлено, что количество беременностей и родов, частота отягощенного акушерского анамнеза, в виде аборт, выкидышей и замершей беременностей в исследуемых подгруппах не различалась. При этом длительность кормления грудью имела статистически значимые различия между РФ-позитивной и РФ-негативной подгруппами исследования, $p=0,049$, $U=375$, $Z= -1,966$, где была более продолжительной среди женщин с РФ-негативной формой РА (рисунок 6).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 6 – Анализ гинекологического анамнеза в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

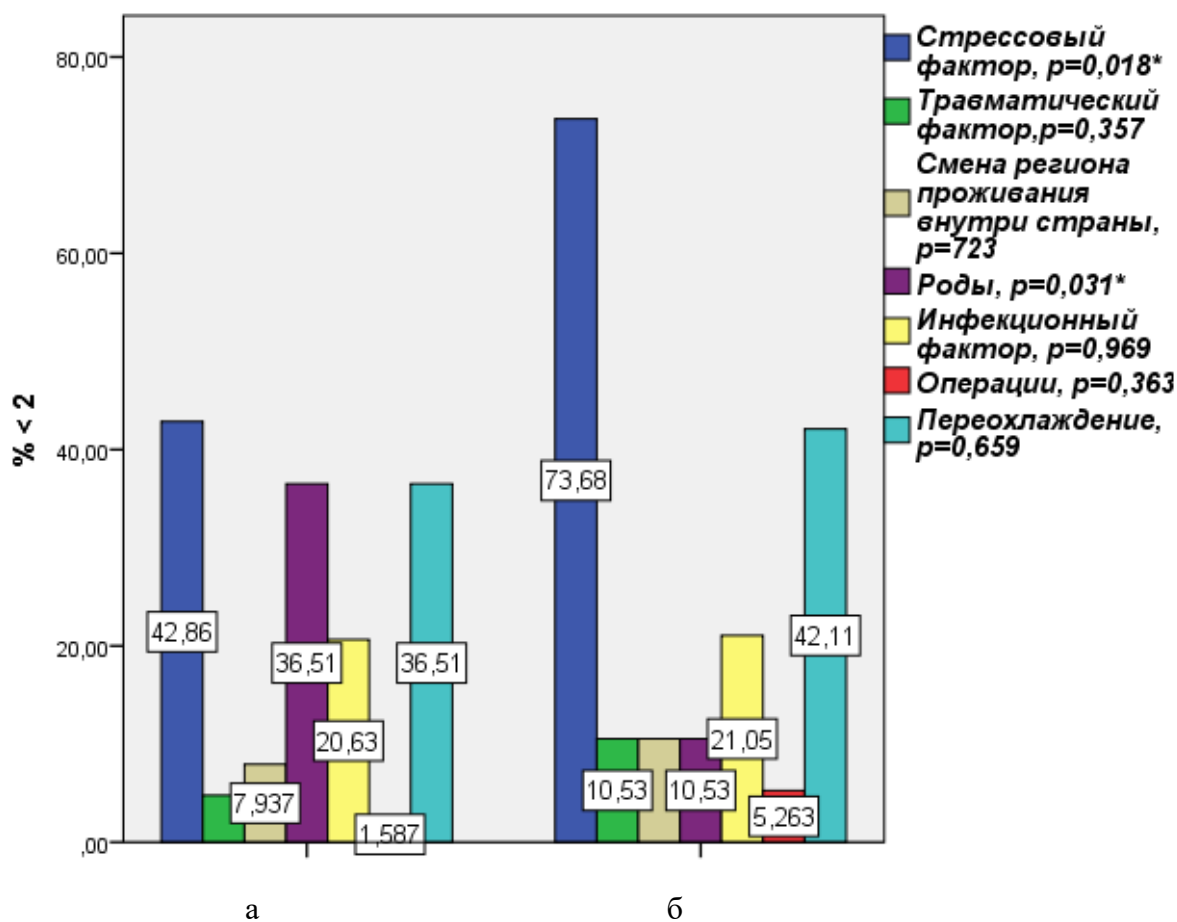
В дальнейшем нами был проведен сравнительный анализ инфекционного фактора, результаты которого представлены на рисунке 7. Было выявлено, что перенесенная коревая инфекция в анамнезе была достоверно чаще среди женщин с РФ-негативной формой РА, $\chi^2=4,962$, $df=1$, $p=0,047$, ОШ=0,188 (95%ДИ: 0,038-0,929), перенесенное инфицирование микобактерией туберкулеза также было достоверно чаще среди пациенток с РФ-негативной формой РА, $\chi^2=6,345$, $df=1$, $p=0,012$, ОШ=0,086 (95%ДИ: 0,008-0,883).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 7 – Анализ инфекционных факторов и наличия онкозаболевания в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

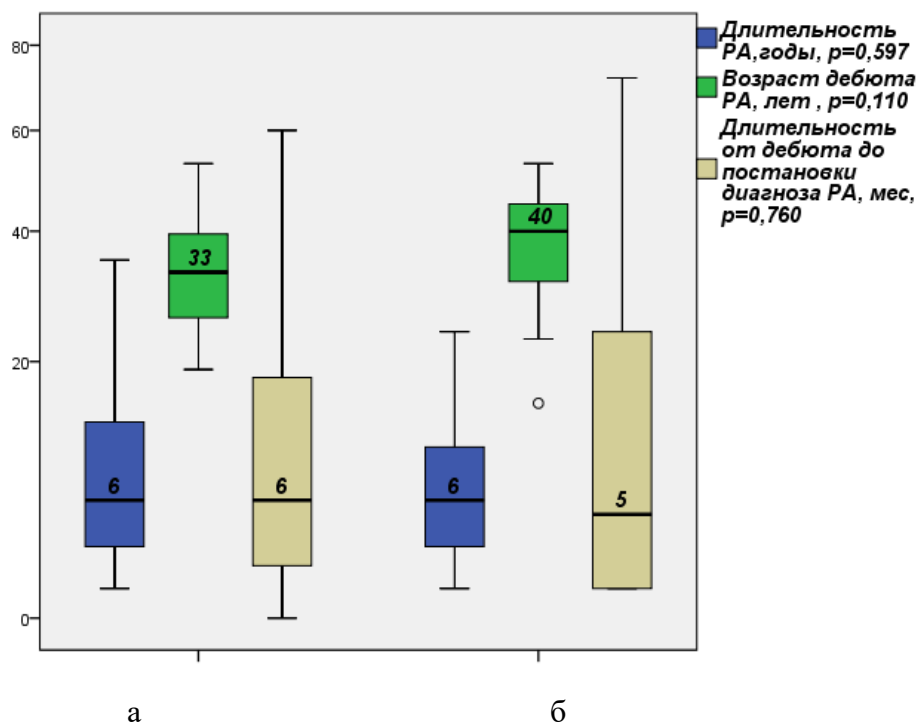
Так же нами был проведен опрос женщин, страдающих РА, о дебюте заболевания, на основании которого, был проведен анализ триггерных факторов, с которыми женщины связывают развитие основного заболевания. Данные представлены на рисунке 8, где наглядно продемонстрировано доминирование стрессового фактора, который несмотря на высокое значение в РФ-позитивной форме РА, достоверно был еще более выше в РФ-негативной форме РА, $\chi^2=5,549$, $df=1$, $p=0,018$, ОШ=0,268 (95%ДИ: 0,086-0,835). Так же следует отметить, что достоверное большее количество женщин с РФ позитивной формой РА связывало манифест заболевания с предшествующими родами, с дебютом в раннем послеродовом периоде, $\chi^2=4,650$, $df=1$, $p=0,0031$, ОШ=4,888 (95%ДИ: 1,035-23,081).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 8 – Анализ триггерных факторов в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

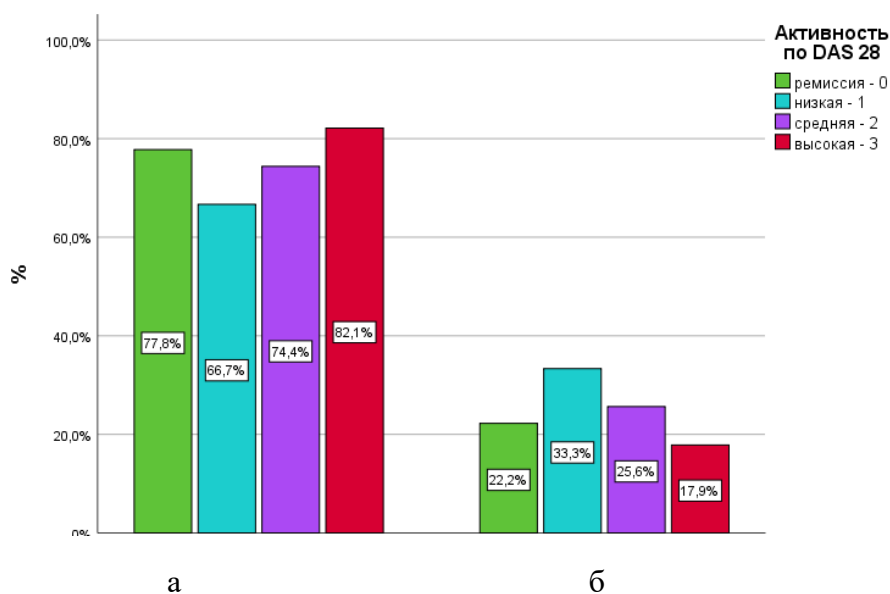
Возраст дебюта РА в исследуемых группах показал отсутствие статистически значимых различий: в первой подгруппе составил 33 года, во второй 40 лет. Длительность от клинического манифеста до постановки диагноза и назначения соответствующей терапии так же не имела статистически значимых различий. Изучая длительность РА на момент включения в исследование так же было выявлено отсутствие статистически значимых различий, таким образом, женщины, страдающие РА РФ-позитивной и РФ-негативной формы, не отличались по данным показателям (рисунок 9).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 9 – Анализ дебюта РА в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

При проведении сравнительного анализа активности заболевания по DAS-28, в который входил ЧБС, ЧПС, ВАШ и СОЭ статистически значимых различий в обеих подгруппах сравнения не выявлено, точный критерий Фишера = 0,753 (рисунок 10).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 10 – Анализ активности заболевания в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

В дальнейшем был проведен сравнительный анализ клинического течения заболевания, который показал преимущественное преобладание суставной формы во всех исследуемых подгруппах. Были выявлены статистически значимые различия в рентгенологической стадии между подгруппами исследования, так в РФ-негативной подгруппе преобладали 1 и 2 рентген стадии, в то время как в РФ-позитивной подгруппе исследования достоверно преобладали 3 и 4 рентген стадии $\chi^2=9,928$, $df=3$, $p=0,0019$. Данные подгруппы исследования также имели статистически значимые различия по стадии заболевания, развернутая стадия достоверно чаще встречалась в РФ-негативной форме заболевания, однако женщины с РФ-позитивной формой заболевания имели достоверно большую частоту случаев развития поздней стадии заболевания, $\chi^2=4,020$, $p=0,045$ (рисунок 11).

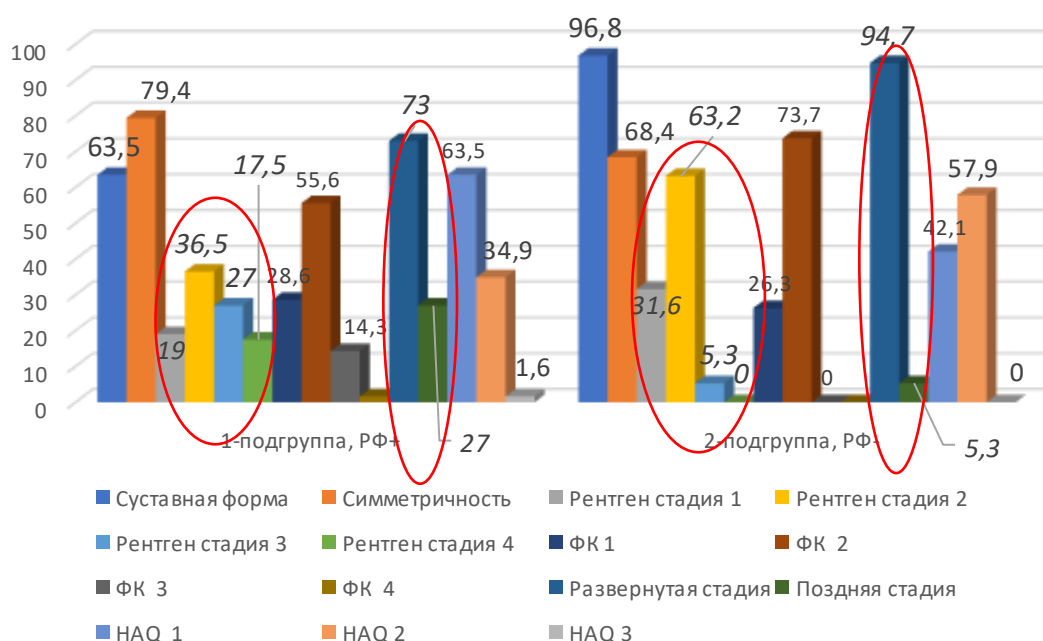
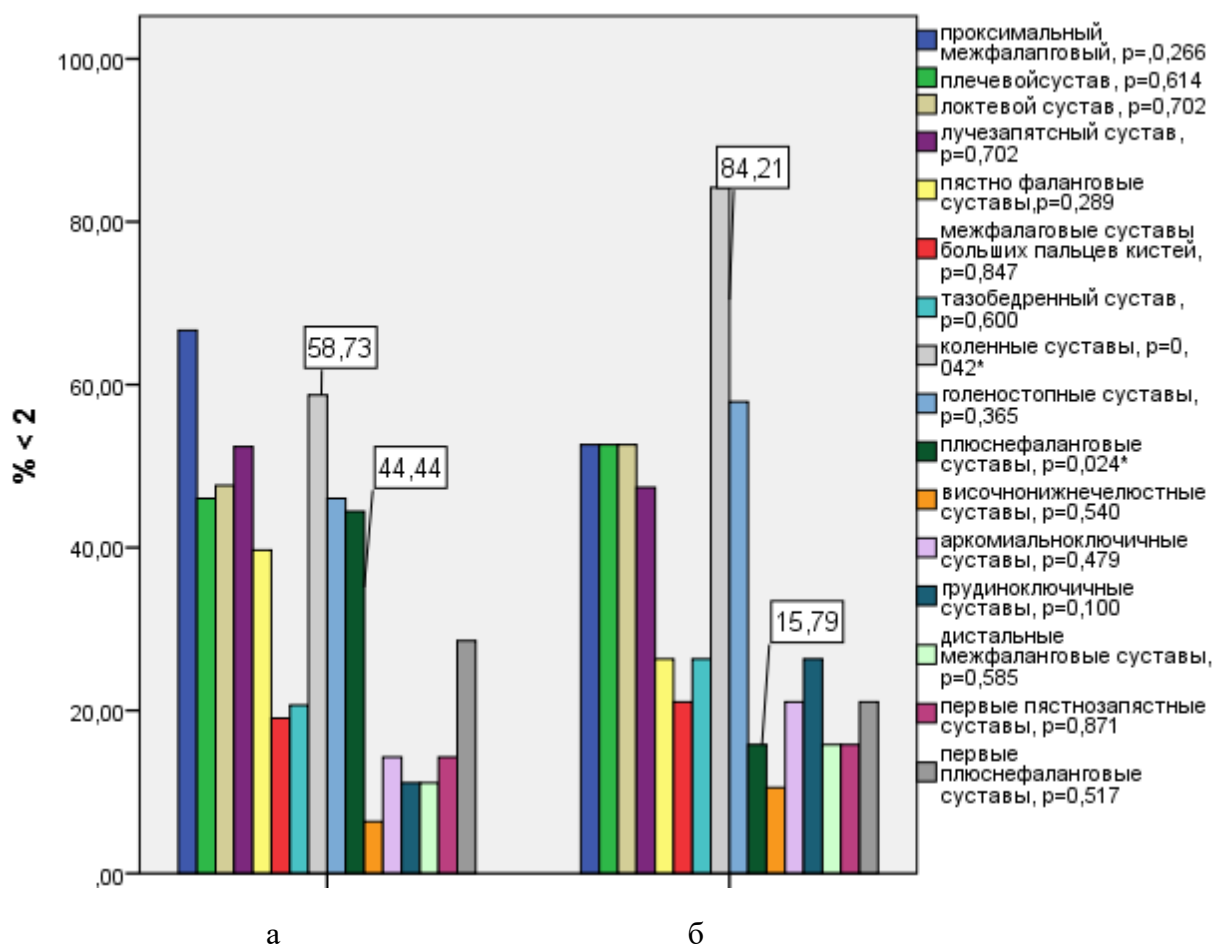


Рисунок 11 – Анализ клинического течения заболевания в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

Далее был проведен анализ суставного синдрома в исследуемых подгруппах, так поражение коленных суставов достоверно чаще встречалось при РФ-негативной форме заболевания $\chi^2=4,146$, $df=1$, $p=0,012$, $p=0,042$, $\phi=0,225$.

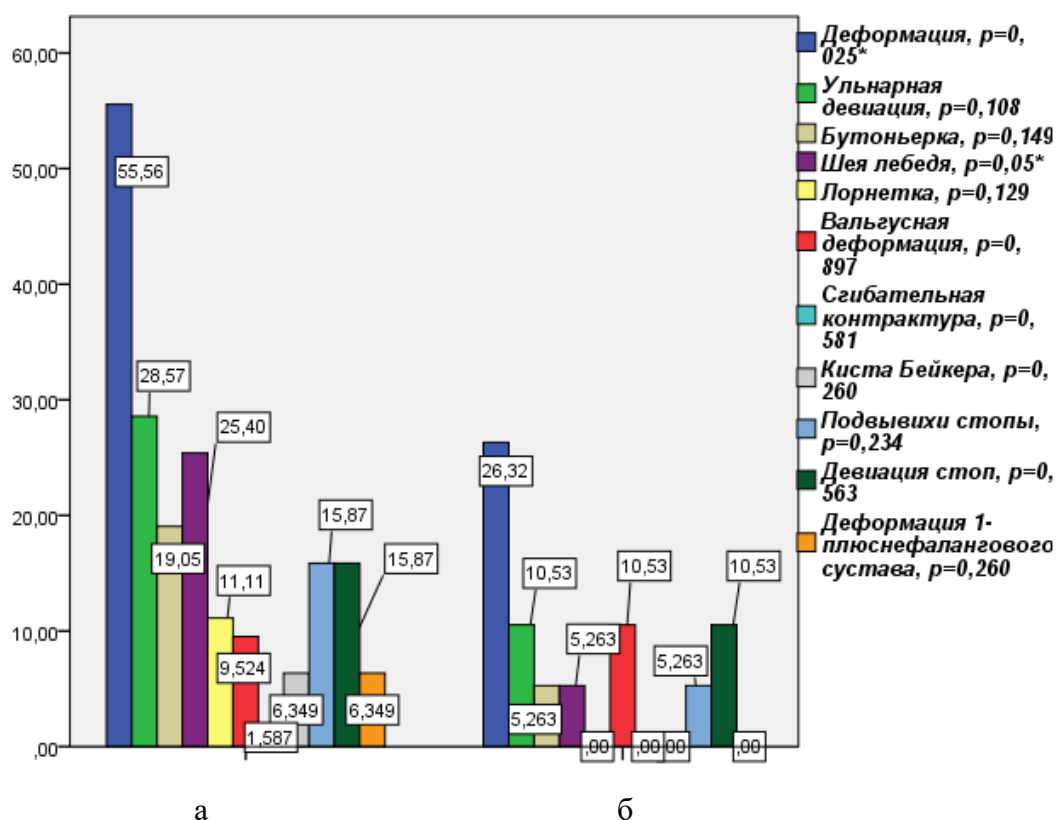
Поражение плюснефаланговых суставов достоверно чаще встречалось в подгруппе с РФ-позитивной формой заболевания $\chi^2=5,09$, $df=1$, $p=0,024$, $\phi=0,249$, ОШ= 4,267 (95%ДИ: 1,129-16,124), (рисунок 12).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 12 – Анализ поражения суставов в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

Далее нами был проведен анализ деформаций между РФ-позитивной и РФ-негативной формами заболевания. Так деформации достоверно чаще встречались в РФ-позитивной форме заболевания, $\chi^2=4,995$, $df=1$, $p=0,025$, $\phi=0,247$, деформация шея лебедя достоверно чаще встречалась у лиц с РФ-позитивной формой заболевания, $p=0,05$, $\chi^2=4,601$, $df=1$, $p=0,05$, $\phi=0,210$ (рисунок 13).



а – первая подгруппа, РФ+; б – вторая подгруппа, РФ-

Рисунок 13 – Анализ деформаций суставов в исследуемых подгруппах с РФ-положительной и РФ-негативной формой заболевания

Сравнительный анализ внесуставных проявлений пациенток с РФ-положительной и РФ-негативной формой заболевания представлен в таблице 13, ревматоидные узелки достоверно чаще встречались у пациенток с РФ-положительной формой заболевания (таблица 13).

Таблица 13 – Анализ внесуставных проявлений в исследуемых подгруппах с РФ-положительной и РФ-негативной формой заболевания

Внесуставные проявления	РФ+ абс/%	95%ДИ	РФ- абс/%	95%ДИ	р
Ревматоидные узелки	22/34,9	23,34-47,97	2/10,5	1,3-33,14	$\chi^2=4,196$ $p=0,041$ $\phi=0,226$
Васкулит внутренних органов	0	-	0	-	-
Васкулит кожи и ногтей	0	-	0	-	-
Нейропатия	2/3,2	0,39-11,0	1/5,3	0,13-26,03	0,552
Плеврит	1/1,6	0,04-8,53	0	-	1,0
Перикардит	0	-	0	-	-
Сетчатое ливедо	0	-	0	-	-
Поражение глаз	1/1,6	0,04-8,53	0	-	1,0
Синдром Шегрена	1/1,6	0,04-8,53	0	-	1,0

Далее проведен анализ осложнений РА у пациенток с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания, данные которого представлены в таблице 14, так остеопороз достоверно чаще встречался в подгруппе с РФ-позитивной формой заболевания.

Таблица 14 – Анализ осложнений в исследуемых подгруппах с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания

Осложнения	РФ+ абс/%	95%ДИ	РФ- абс/%	95%ДИ	p
Остеонкероз	0	-	0	-	-
Атеросклероз	0	-	0	-	-
Остеопороз	16/25,4	15,27-37,94	0	-	$\chi^2=5,955$, df=1, p= 0,014
Вторичный ОА	6/9,5	3,58-19,59	0	-	0,328
Амилоидоз	0	-	0	-	-
Туннельный синдром	2/3,2	0,39-11,0	0	-	1,0
Подвывих в атланта-аксиальном суставе	0	-	0	-	-

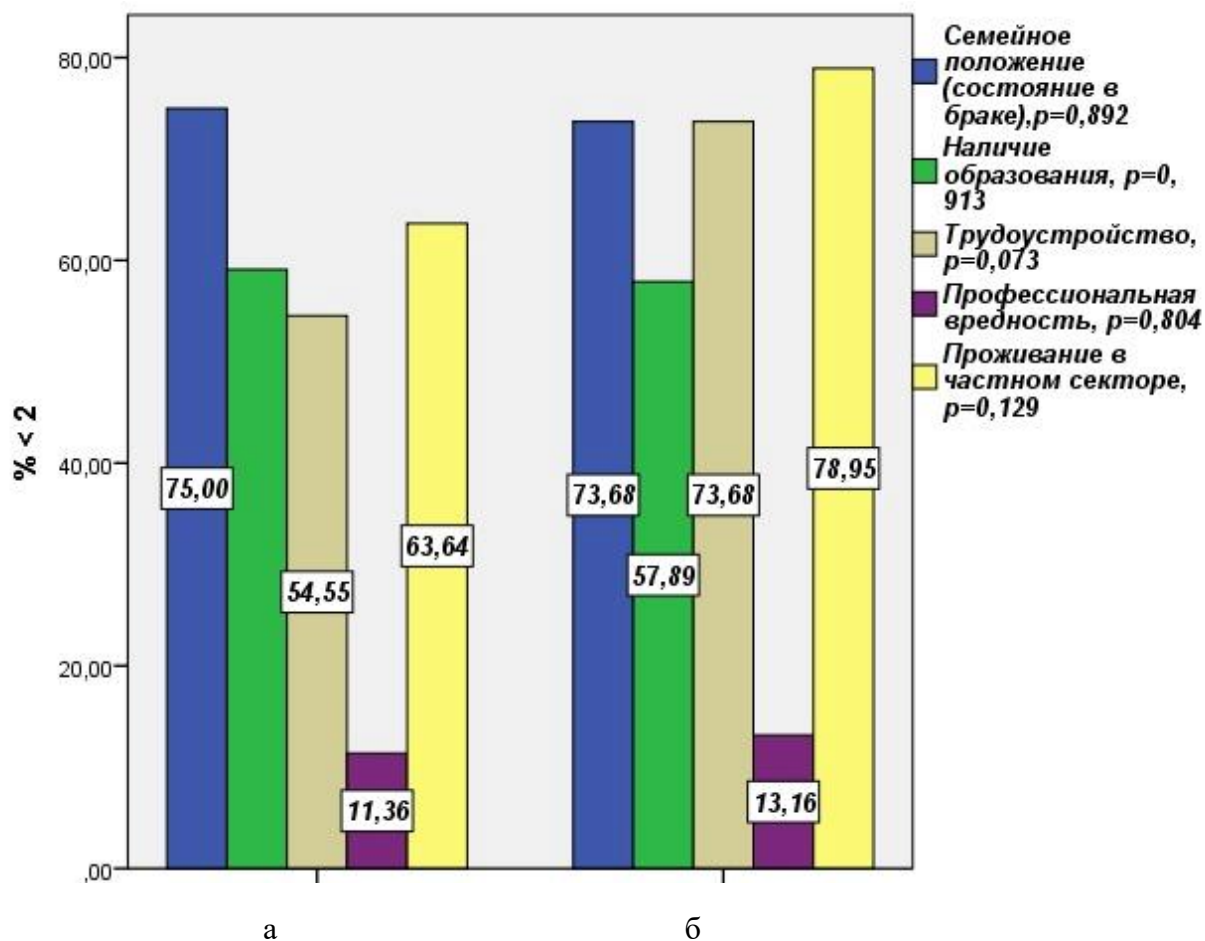
Таким образом при сравнении подгрупп с РФ-позитивной и РФ-негативной формой заболевания продемонстрировало более тяжелое течение РА в подгруппе с РФ-позитивной формой заболевания, с преобладанием такого провоцирующего фактора, как роды, связанное с наличием более высокой рентген стадией, наличием деформаций, более тяжелым течением, наличием внесуставных проявлений и осложнений в данной подгруппе.

3.2.2 Клинико-anamнестические характеристики исследуемых женщин в зависимости от АЦЦП статуса

В дальнейшем нами был проведен сравнительный анализ клинического течения заболевания основной группы исследования в зависимости от наличия антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), таким образом основную группу исследования 82 женщин мы разделили на 2 подгруппы в зависимости от АЦЦП статуса, первую подгруппу составили женщины имевшие АЦЦП-позитивную форму заболевания в количестве 44 человек, вторую подгруппу составили женщины с АЦЦП-негативной формой заболевания в количестве 38 человек.

При проведении сравнительного анализа по возрасту исследуемых женщин не было выявлено статистически значимых различий $p=0.967$, АЦЦП +Me=44 (38-50,5), АЦЦП - 46 лет (37,7-50).

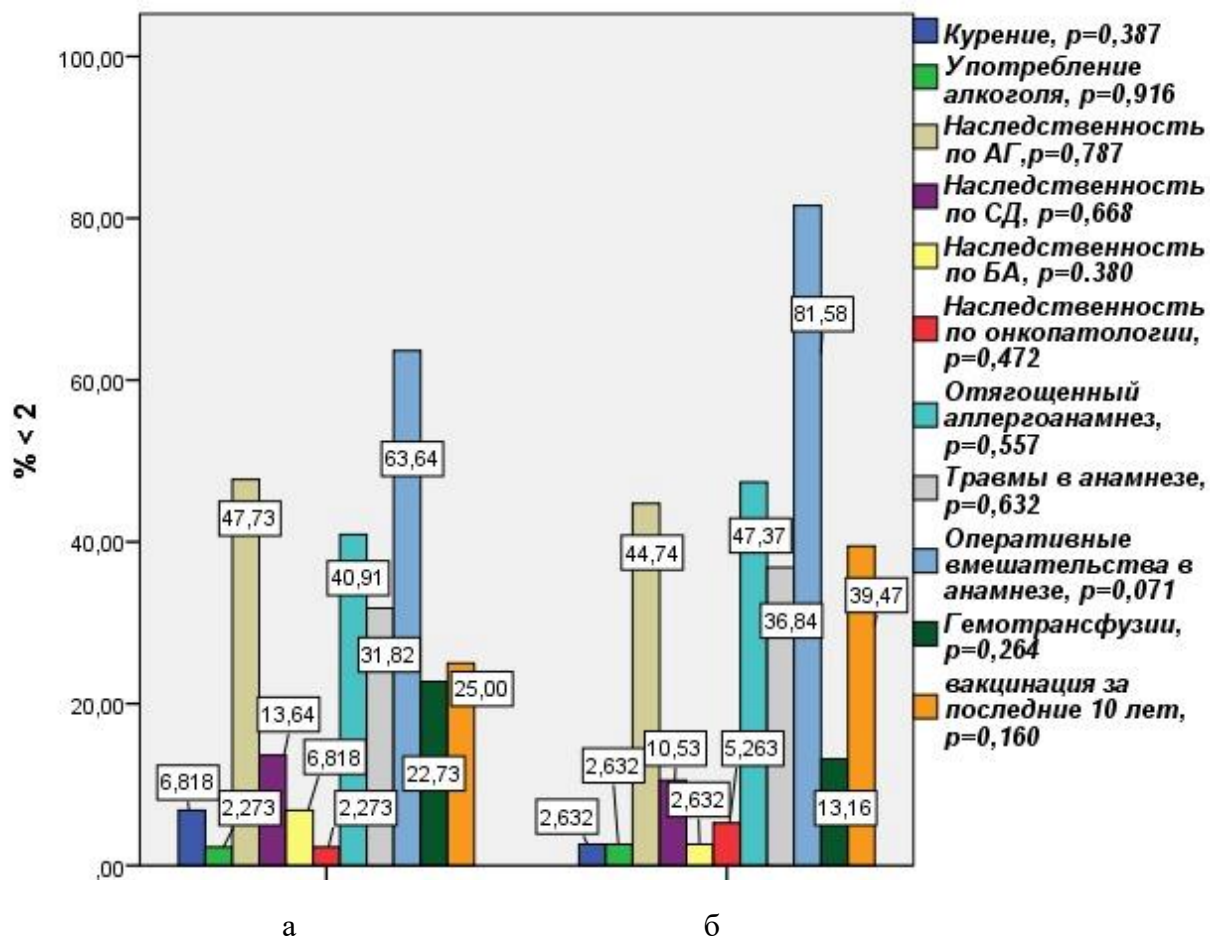
Анализируя социальный статус пациенток с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формами заболевания, статистически значимых различий выявлено не было (рисунок 14).



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 14 – Анализ социального статуса в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

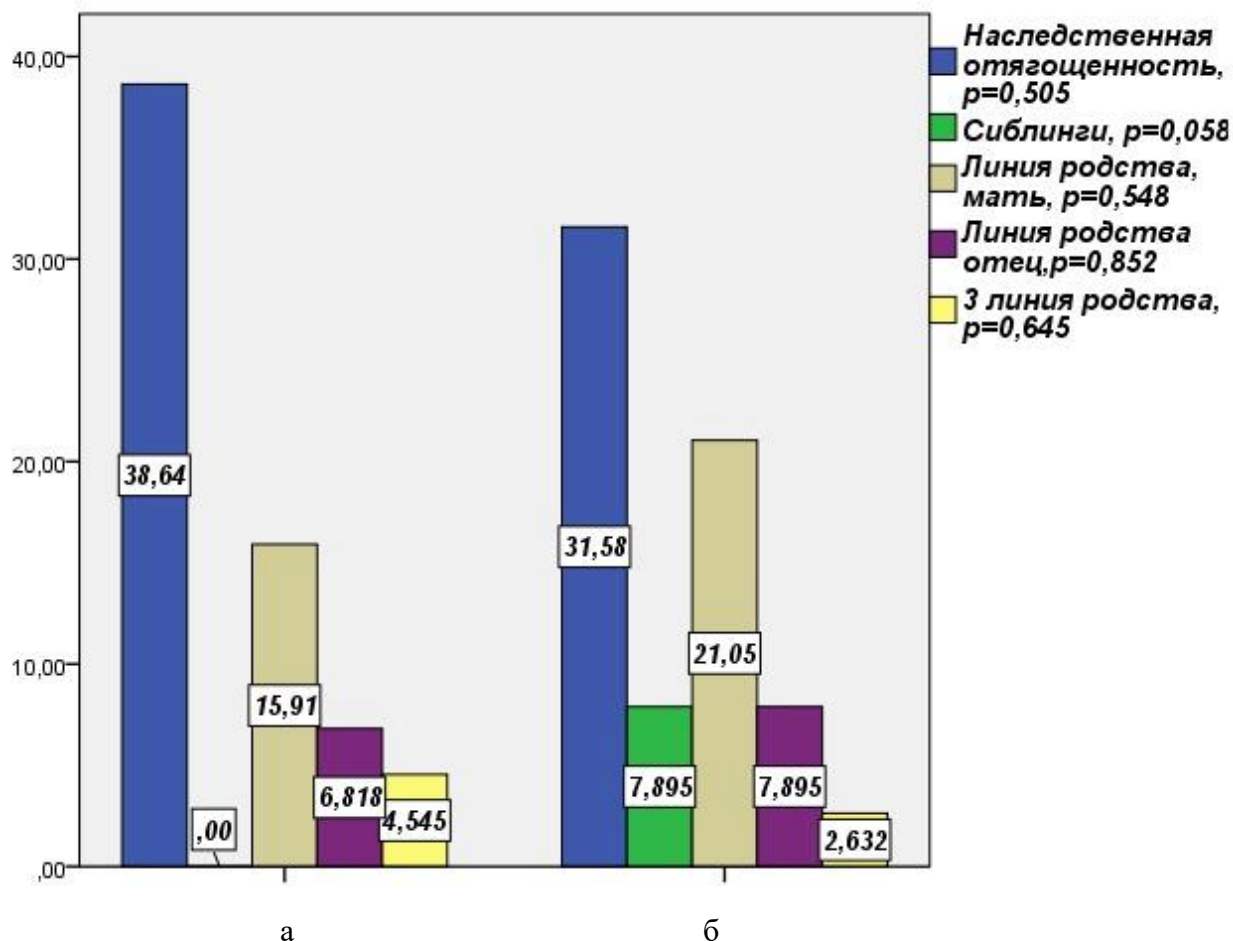
В дальнейшем нами были проанализированы анамнестические данные пациенток с РА, достоверных различий в частоте вредных привычек, наследственной отягощенности по различным заболеваниям, по перенесенным травмам, оперативным вмешательствам, гемотрансфузиям в анамнезе и вакцинациям за последние 10 лет выявлено не было (рисунок 15).



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 15 – Анализ анамнестических данных в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

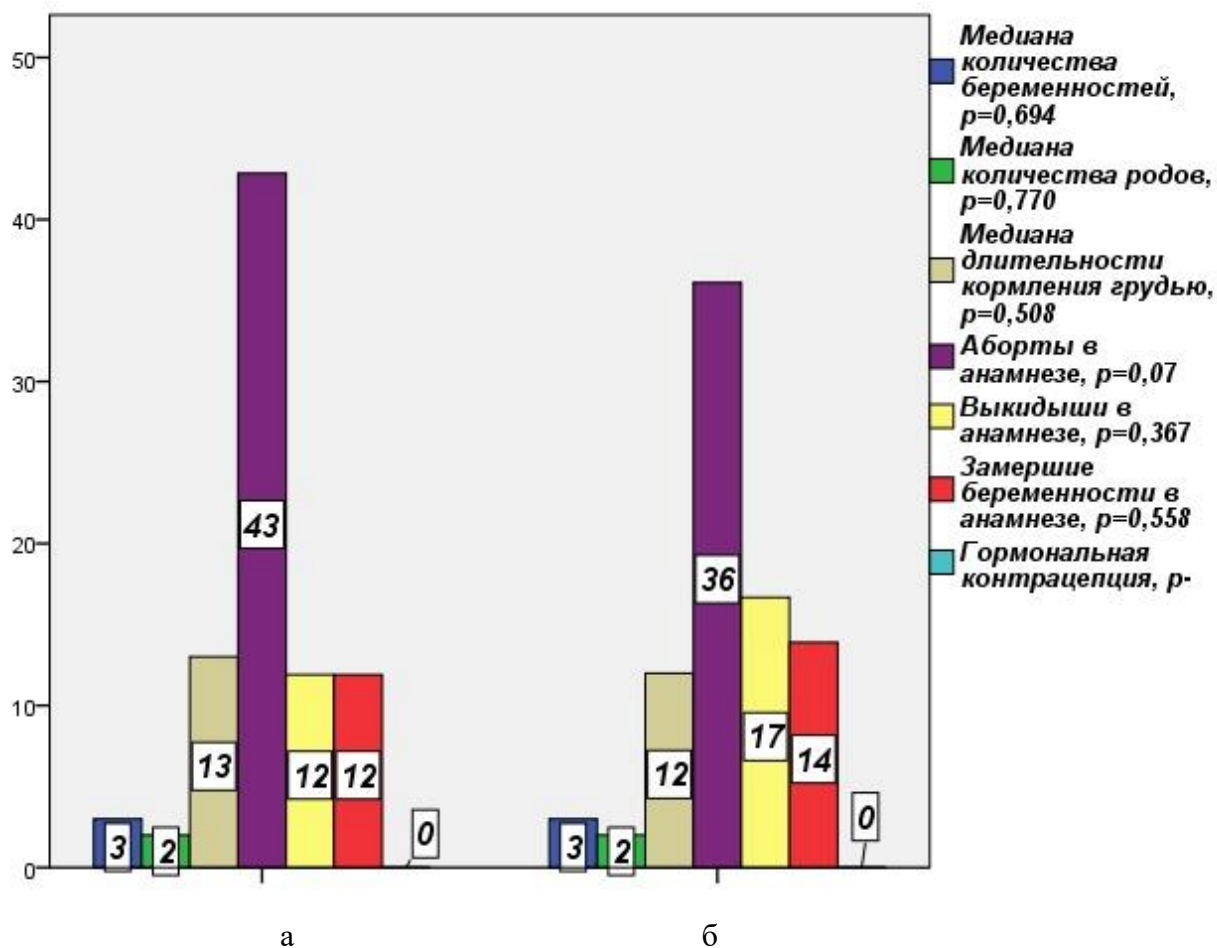
При проведении сравнительного анализа наследственной отягощенности по РА, статистически значимых различий ни в самой наследственности в целом, ни по линиям родства по отдельности, не выявлено (рисунок 16).



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 16 – Анализ наследственной отягощенности по РА в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

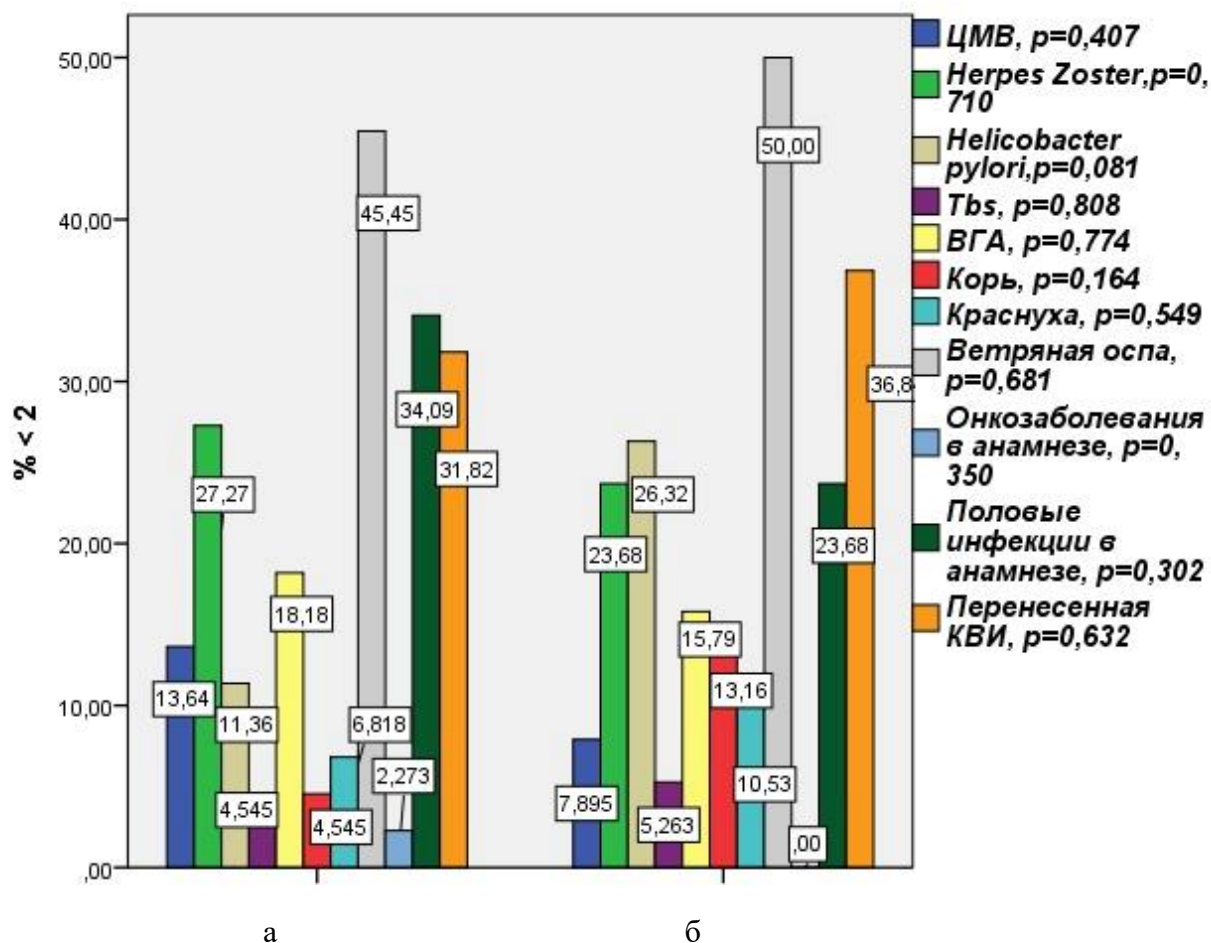
При сравнительном анализе гинекологического анамнеза среди исследуемых женщин страдающих АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания статистически значимых различий не выявлено (рисунок 17).



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 17 – Анализ гинекологического анамнеза в исследуемых подгруппах с АЦЦП-положительной и АЦЦП-отрицательной формой заболевания

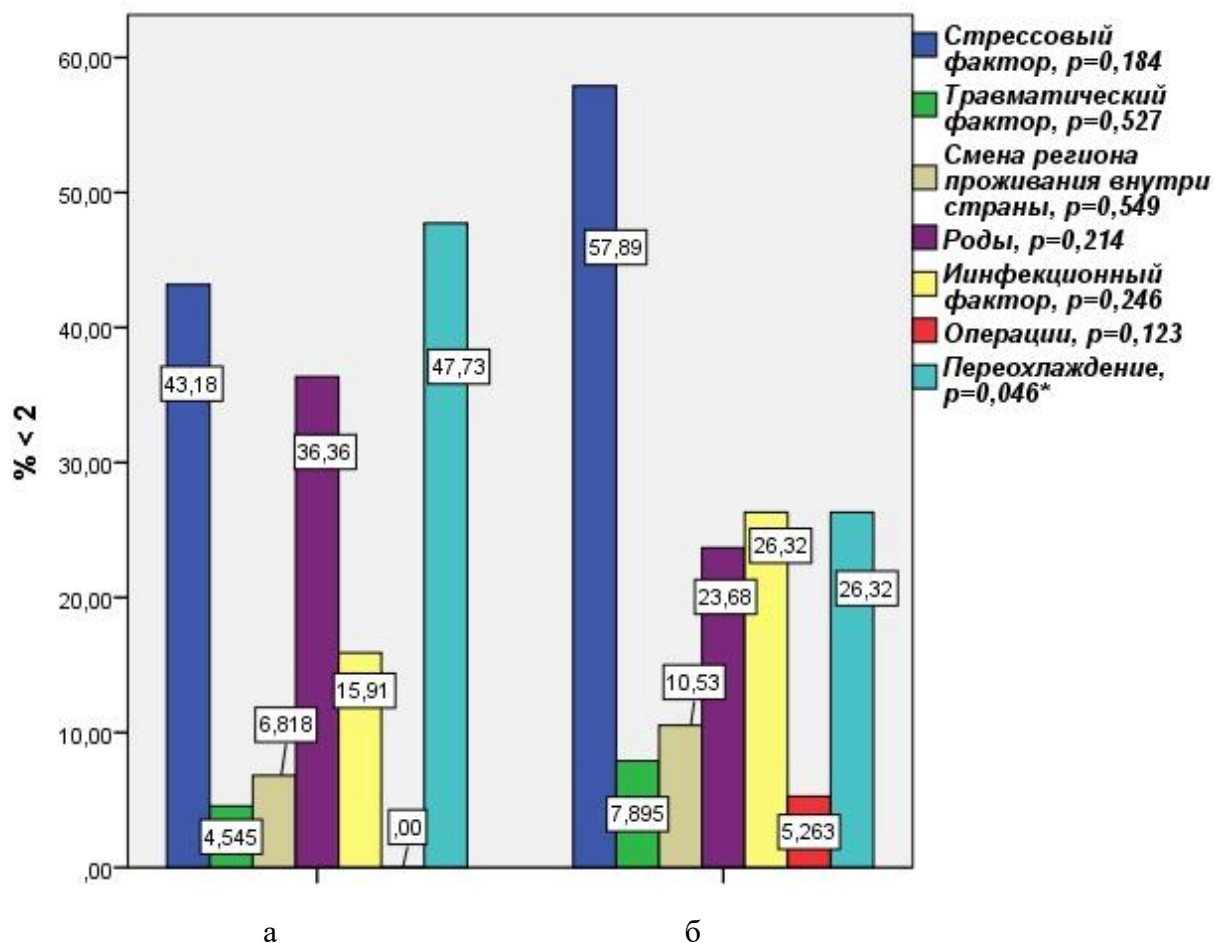
При проведении сравнительного анализа инфекционного фактора статистически значимых различий не выявлены, результаты представлены на рисунке 18.



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 18 – Анализ инфекционных факторов и наличия онкозаболевания в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

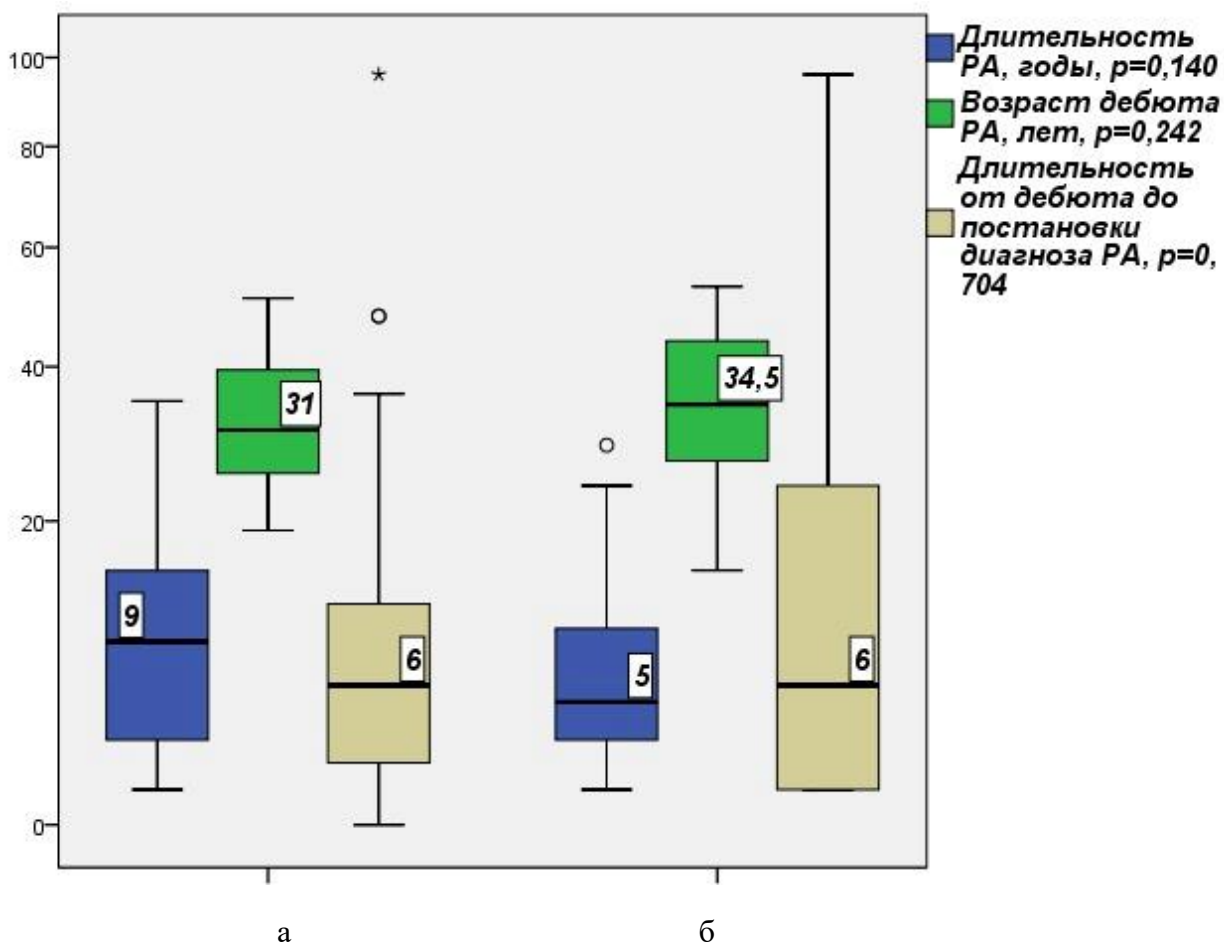
Далее нами был проведен анализ триггерных факторов, с которыми женщины связывали развитие основного заболевания. Следует отметить, что достоверное большее количество женщин с АЦЦП-позитивной формой РА связывало развитие РА с переохлаждением, $\chi^2=3,976$, $df=1$, $p=0,046$, ОШ=2,557 (95%ДИ: 1,005–6,502), (рисунок 19).



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 19 – Анализ триггерных факторов в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

В дальнейшем нами был проведен анализ дебюта заболевания между подгруппами с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания. Возраст дебюта РА в исследуемых подгруппах показал отсутствие статистически значимых различий: в первой подгруппе составил 31 год, во второй 34,5 лет. Длительность от клинической манифестации до постановки диагноза и назначения соответствующей терапии так же не имела статистически значимых различий. Изучая длительность РА на момент включения в исследование так же было выявлено отсутствие статистически значимых различий, таким образом женщины страдающие РА АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формы не отличались по данным показателям (рисунок 20).

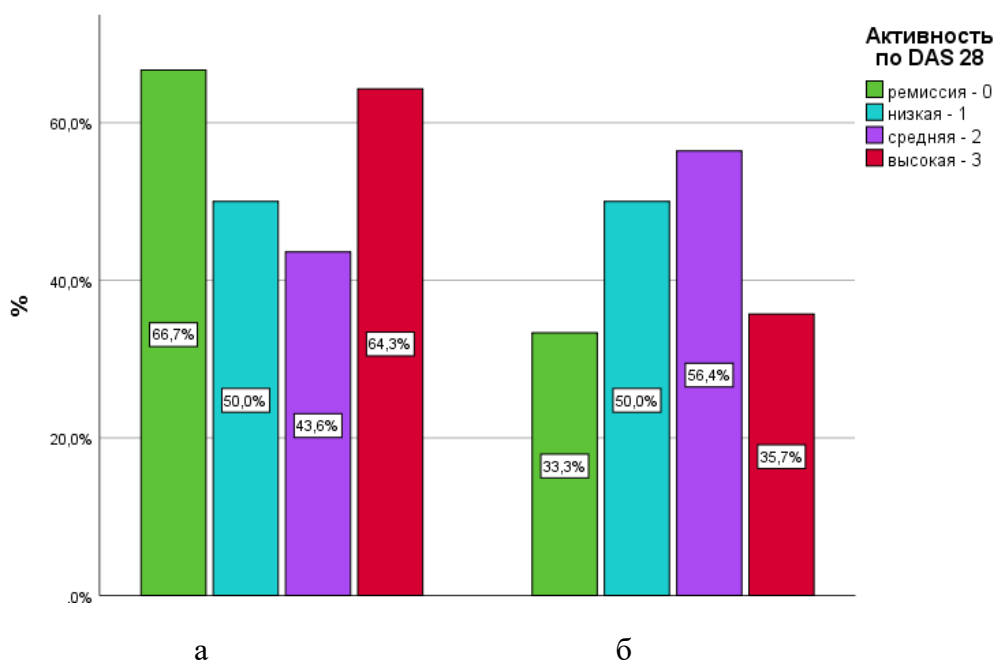


а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 20 – Анализ дебюта РА в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

При проведении сравнительного анализа активности заболевания по DAS-28, в который входил ЧБС, ЧПС, ВАШ и СОЭ, статистически значимых различий в обеих подгруппах исследования не выявлено, точный критерий Фишера= 0,325 (рисунок 21).

В дальнейшем был проведен сравнительный анализ клинического течения заболевания, который показал преимущественное преобладание суставной формы во всех исследуемых подгруппах. Были выявлены статистически значимые различия в стадии заболевания между подгруппами исследования, так в АЦЦП-негативной подгруппе развернутая стадия заболевания встречалась достоверно чаще, $\chi^2=8,167$, $df=1$, $p=0,004$, $\phi=0,316$, $p=0,004$ (рисунок 22).



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 21 – Анализ активности заболевания в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

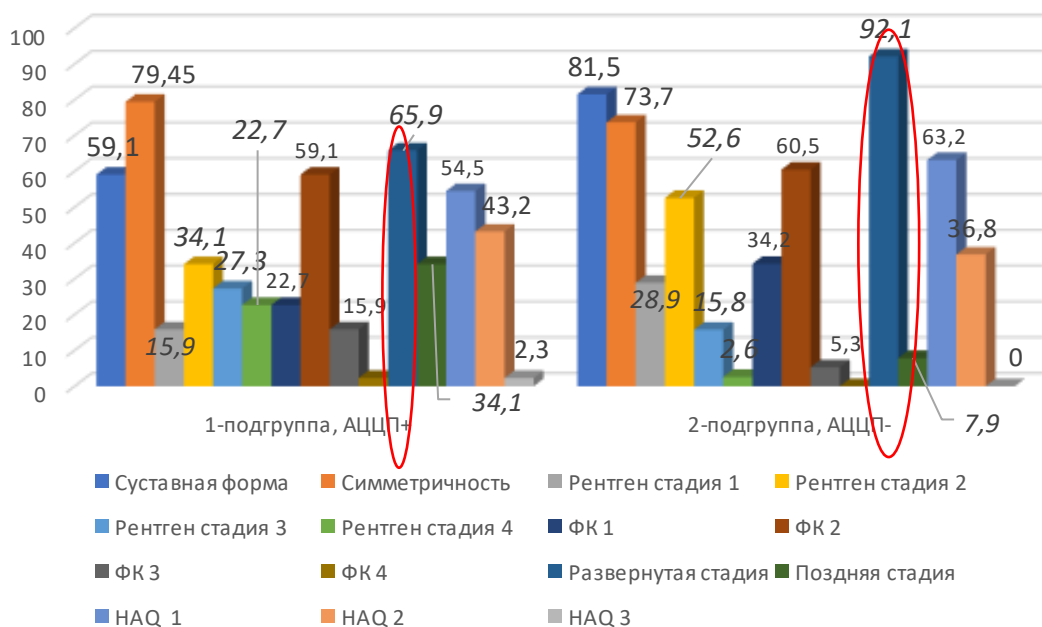
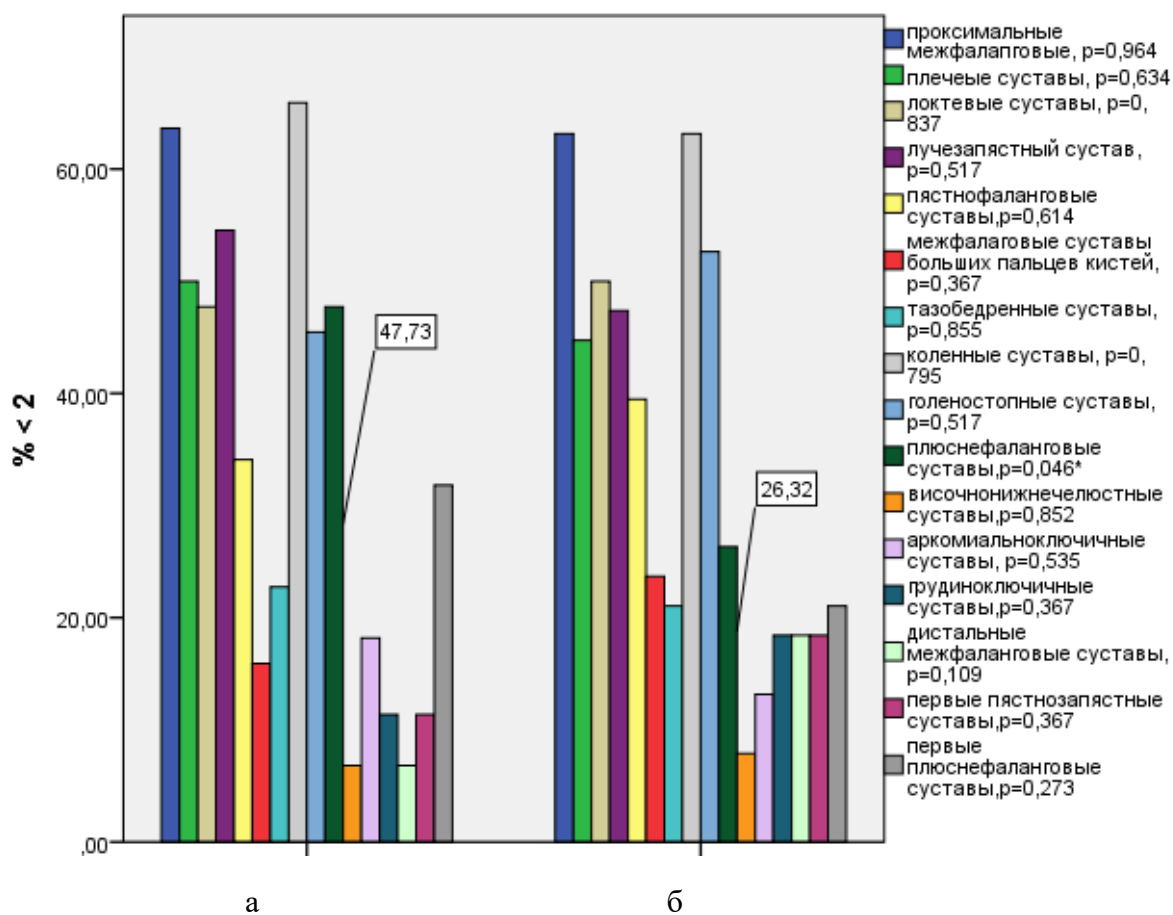


Рисунок 22 – Анализ клинического течения заболевания в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

Далее был проведен анализ суставного синдрома в исследуемых подгруппах, так поражение плюснефаланговых суставов достоверно чаще встречалось в подгруппе с АЦЦП-позитивной формой заболевания $\chi^2=3,976$, $df=1$, $p=0,046$, ОШ= 2,557(95%ДИ:1,005-6,502), (рисунок 23).

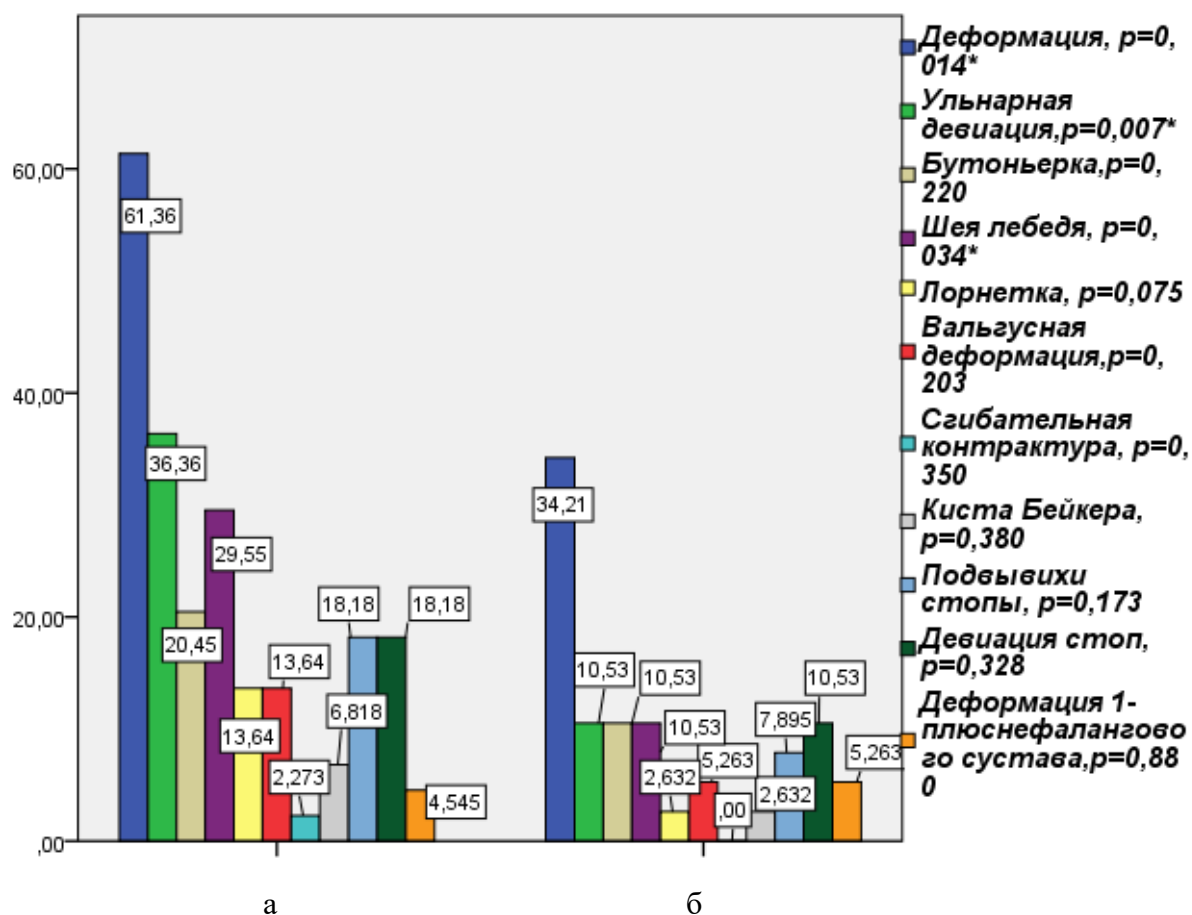


а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 23 – Анализ поражения суставов в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

Далее был проведен анализ деформаций между подгруппами с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания, таким образом деформации встречались достоверно чаще в АЦЦП-позитивной подгруппе исследования, $\chi^2=6,017$, $df=1$, $p=0,014$, $\phi=-0,271$, ульнарная девиация достоверно чаще встречалась в подгруппе с АЦЦП-позитивной формой заболевания, $\chi^2=7,381$, $df=1$, $p=0,0007$, ОШ=4,857 (95%ДИ: 1,456-16,198), шея лебедя так же достоверно чаще встречалась среди пациенток с АЦЦП-позитивной формой РА, $\chi^2=4,488$, $df=1$, $p=0,034$, ОШ=3,565 (95%ДИ: 1,50-12,095), (рисунок 24).

Сравнительный анализ внесуставных проявлений у пациенток РА с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания представлен в таблице 15. Так ревматоидные узелки достоверно чаще встречались у пациенток с АЦЦП-позитивной формой заболевания, в то время как остальные внесуставные проявления не имели статистически значимых различий.



а – первая подгруппа, АЦЦП+; б – вторая подгруппа, АЦЦП-

Рисунок 24 – Анализ деформаций суставов в исследуемых подгруппах с АЦЦП-положительной и АЦЦП-негативной формой заболевания

Таблица 15 – Анализ внесуставных проявлений в исследуемых подгруппах с АЦЦП-положительной и АЦЦП-негативной формой заболевания

Показатели	АЦЦП+	95%ДИ	АЦЦП-	95%ДИ	p
Ревматоидные узелки	17/36,8	24,36-54,50	7/18,4	7,74-34,33	$\chi^2=4,025$, df=1, p=0,045, ОШ=2,788 (95%ДИ: 1,005-7,735)
Синдром Шегрена	1/2,3	0,06-12,02	0	-	1,0
Васкулит внутренних органов	0	-	0	-	-
Васкулит кожи и ногтей	0	-	0	-	-
Нейропатия	1/2,3	0,06-12,02	0	-	1,0
Плеврит	1/2,3	0,06-12,02	2/5,3	0,64-17,75	0,472
Перикардит	0	-	0	-	-
Сетчатое ливедо	0	-	0	-	-
Поражение глаз	1/2,3	0,06-12,02	0	-	1,0

Далее проведен анализ осложнений РА у пациенток с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания, данные которого представлен в таблице 16, так остеопороз и вторичный остеоартроз достоверно чаще встречался в подгруппе с АЦЦП-позитивной формой заболевания.

Таблица 16 – Анализ осложнений в исследуемых подгруппах с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания

Показатели	АЦЦП+ абс/%	95%ДИ	АЦЦП- абс/%	95%ДИ	p
Остеонекроз	0	-	0	-	-
Атеросклероз	0	-	0	-	-
Остеопороз	13/29,5	16,76-45,2	3/7,9	1,66-21,38	$\chi^2=6,086$, df=1, p=0,014
Вторичный ОА	6/13,6	5,17-27,35	0	-	$\chi^2=5,591$, df=1, p=0,018
Амилоидоз	0	-	0	-	
Туннельный синдром	2/4,5	0,56-15,47	0	-	0,497
Подвывихи в атланта-аксиальном сочленении	0	-	0	-	-

Таким образом сравнительный анализ подгрупп с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формой заболевания продемонстрировал более тяжелое течение РА в подгруппе с АЦЦП-позитивной формой заболевания, с преобладанием провоцирующего фактора в виде переохлаждения, наличием деформаций, наличием внесуставных проявлений и осложнений в данной подгруппе.

3.2.3 Анализ клинико-лабораторных данных исследуемых групп

Далее был проведен анализ лабораторных данных между группами исследования. При сравнении основной и контрольной группы безусловно имели статистически значимые различия, так как у участников контрольной группы значения лабораторных показателей были в диапазоне нормальных референтных значений.

В связи с этим сравнительный анализ проводился между подгруппами по РФ и АЦЦП статусу.

Далее нами проведен корреляционный анализ лабораторных показателей, между подгруппами в зависимости от РФ статуса, таким образом в таблице 17 представлены значимые корреляционные связи у пациенток с РФ-позитивной формой заболевания, обращает на себя внимание отрицательная корреляционная связь активности заболевания с уровнем альбумина, а также большая корреляционная связь с бетта-2 глобулинами и гамма-глобулинами.

Таблица 17 – Корреляционный анализ в подгруппе с РФ-позитивной формой заболевания

РФ+		ЧБС	ЧПС	ВАШ	Длительность РА	DAS28
СРБ	ρ	0,416	0,276	0,391	0,390	0,575
	p	0,01	0,029	0,002	0,002	<0,001
Альбумин	ρ	-0,342	-0,322	-0,353	-	-0,612
	p	0,006	0,01	0,005	-	<0,001
Холестерин	ρ	-	-	-	0,362	
	p	-	-	-	0,004	
Бета-2 глобулины	ρ	-	0,258	-	0,251	0,391
	p	-	0,041	-	0,047	0,002
Гамма глобулины	ρ	-		-	-0,278	0,305
	p	-		-	0,028	0,015

В дальнейшем нами проведен корреляционный анализ лабораторных показателей в подгруппе с РФ-негативной формой заболевания (таблица 18), в результате которого были выявлена большая связь DAS28 с гамма-глобулинами, а также ЧПС с альфа-1 глобулинами.

Таблица 18 – Корреляционный анализ в подгруппе с РФ-негативной формой заболевания

РФ-		ЧБС	ЧПС	ВАШ	Длительность РА	DAS28
Альфа-1 глобулин	ρ	-	0,460	-	-	
	p	-	0,047	-	-	
Гамма глобулины	ρ	-		-	-	0,500
	p	-		-	-	0,029

Далее нами проведен корреляционный анализ лабораторных показателей, между подгруппами в зависимости от АЦЦП статуса, таким образом в таблице 19 представлены значимые корреляционные связи у пациенток с АЦЦП - позитивной формой заболевания, в результате которого, была выявлена большая корреляционная связь активности заболевания с альфа-1 глобулинами и бетта-2 глобулинами. Так же обращает на себя внимание отрицательная корреляционная связь активности заболевания с альбумином.

Таблица 19 - Корреляционный анализ в подгруппе с АЦЦП-позитивной формой заболевания

АЦЦП+		ЧБС	ЧПС	ВАШ	Длительность РА	DAS 28
Альфа-1 глобулины	ρ	0,370	0,460	0,475	-	0,572
	p	0,014	0,002	0,001	-	<0,001
Бетта-2 глобулины	ρ	-	0,399	0,340	-	0,471
	p	-	0,007	0,024	-	0,01
Альбумин	ρ	-	-0,302	-0,371	-	-0,559
	p	-	0,047	0,013	-	<0,001

В дальнейшем нами проведен корреляционный анализ лабораторных показателей в подгруппе с АЦЦП-негативной формой заболевания (таблица 20). Отмечается большая корреляционная связь активности заболевания с антителами SS-A Ro и SS-B La.

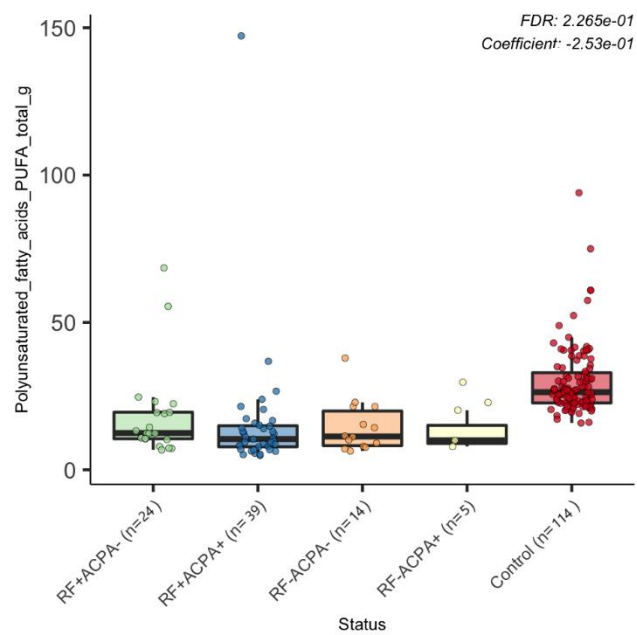
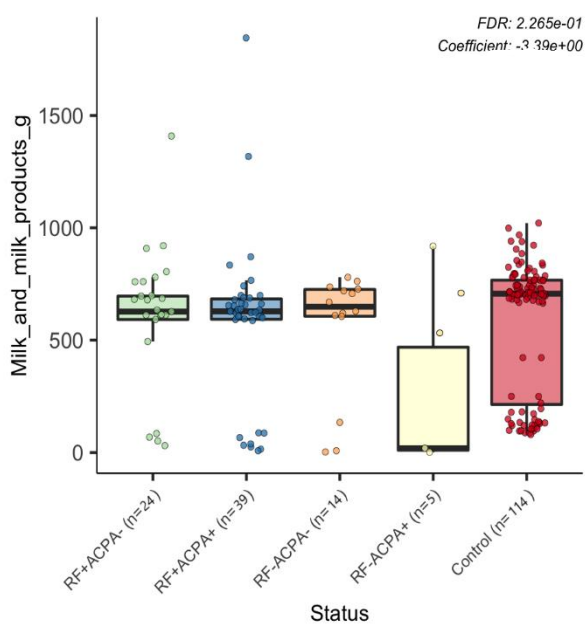
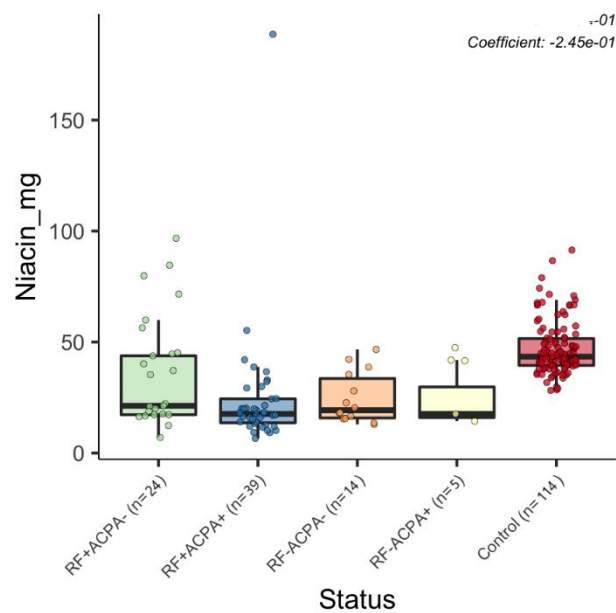
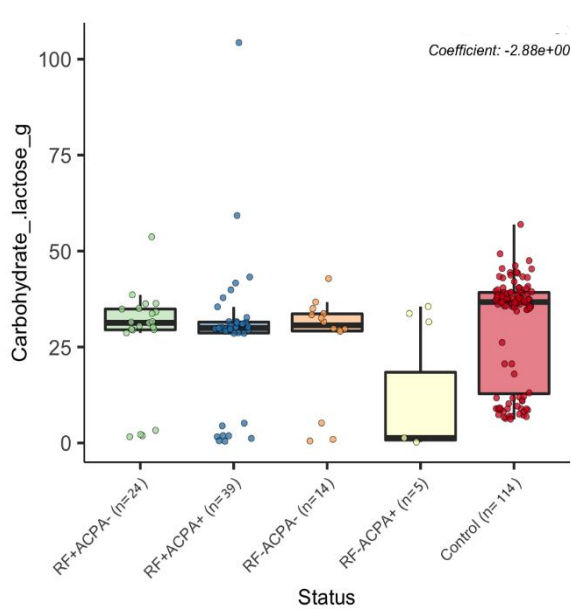
Таблица 20 – Корреляционный анализ в подгруппе с АЦЦП-негативной формой заболевания

АЦЦП-		ЧБС	ЧПС	ВАШ	Длительность РА	DAS28
Общий белок	ρ	0,365	-	-	-	0,383
	p	0,024	-	-	-	0,018
Альбумин	ρ	-0,436	-0,377	-0,400	-	-0,608
	p	0,006	0,020	0,013	-	<0,001
Гамма глобулины	ρ	0,426	0,378	-	-	0,515
	p	0,008	0,019	-	-	0,001
Антитела SS-A Ro	ρ	0,357	-	-	-0,356	0,324
	p	0,028	-	-	0,028	0,047
Антитела SS-B La	ρ	-	-	-	-0,326	0,331
	p	-	-	-	0,046	0,042

Таким образом лабораторные показатели имели статистические значимые различия в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, все формы заболевания имели корреляционные взаимосвязи активности заболевания по DAS28 с белковыми фракциями, наибольшее число корреляций отмечается при РФ-позитивной форме заболевания, обращает на себя внимание наличие большой связи DAS28 с антителами синдрома Шегрена при АЦЦП-негативной форме заболевания.

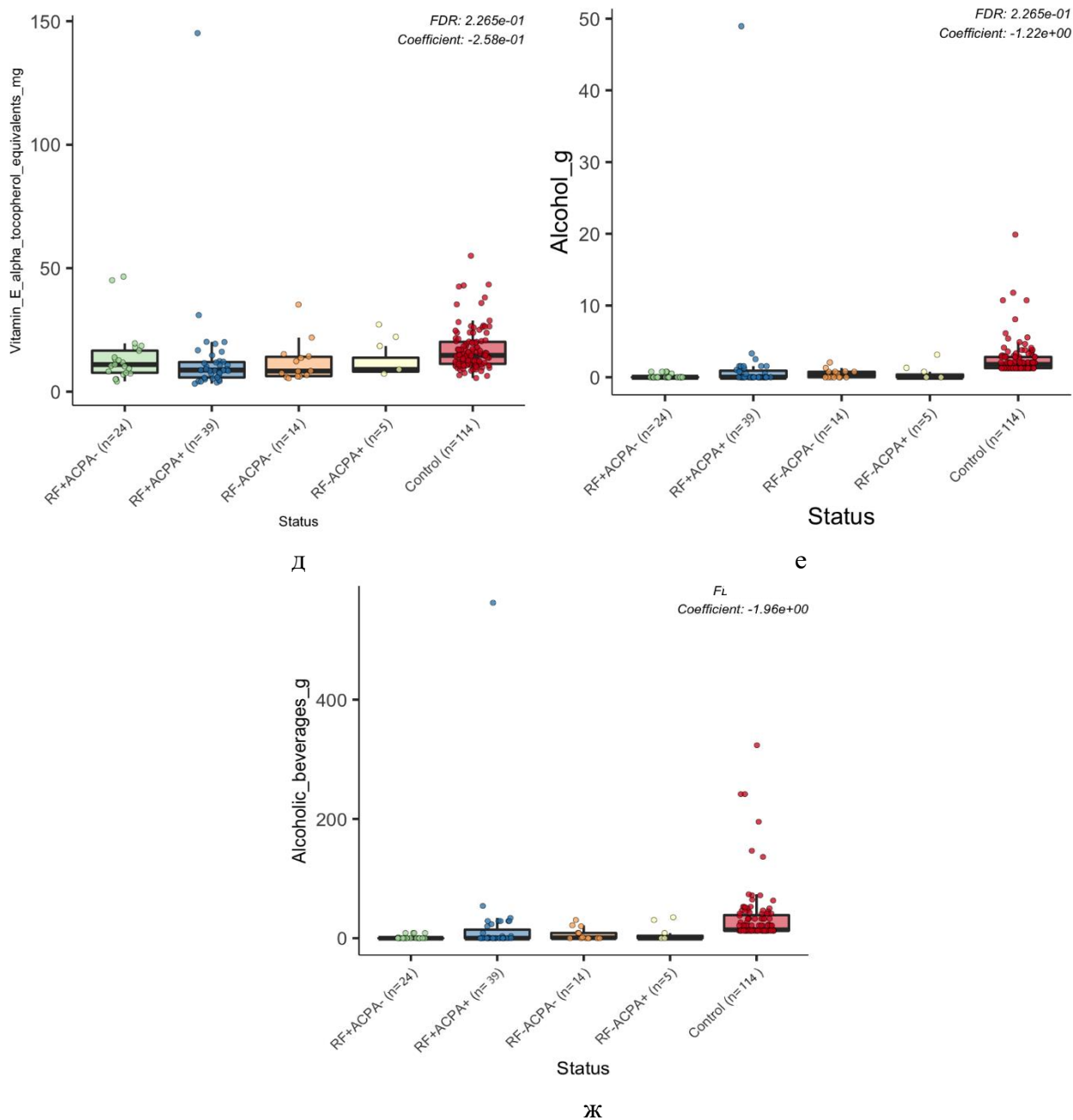
3.2.4 Анализ результатов опросника FFQ

В дальнейшем нами был проведен анализ по данным опросника пищевых предпочтений FFQ. Ниже представлены результаты по статистически значимым нутриентам (рисунок 25).



а – лактоза; б – ниацин; в – молоко и молочные продукты; г – полиненасыщенные жирные кислоты

Рисунок 25 – Сравнительный анализ статистически значимых нутриентов между основной и контрольной группой, лист 1



д – витамин Е; е – алкоголь; ж – алкоголь содержащие напитки

Рисунок 25, лист 2

По результатам сравнительного анализа, выявлено значительно превалирующее потребление данных нутриентов контрольной группой исследования.

Пациентки с РА достоверно меньше потребляли алкоголь содержащие напитки ($p=0,005$), молоко и молочные продукты ($p=0,002$), продукты, содержащие алкоголь ($p=0,006$), лактозу ($p=0,003$), ниацин ($p=0,006$), витамин Е ($p=0,001$), полиненасыщенные жирные кислоты ($p=0,004$), (таблица 21).

Таблица 21 – Анализ статистически значимых нутриентов между основной и контрольной группой

Нутриенты	Coef	stderr	p
Алкоголь, г	-1,22e+00	0,444	0,006
Лактоза, г	-2,88 e+00	0,962	0,003
Ниацин, мг	-2,45 e+00	0,089	0,006
Витамин Е (альфа-токоферол), мг	-2,58 e+00	0,077	0,001
Полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA), г	-2,53 e+00	0,087	0,004
Алкоголь-содержащие напитки, г	-1,96 e+00	0,694	0,005
Молоко и молочные продукты, г	-3,39 e+00	1,108	0,002

Далее нами осуществлен анализ MaAsLin2 (Microbiome Multivariable Associations with Linear Model - Многомерные ассоциации микробиома с Линейной моделью), (рисунок 26).

Significant associations (-log(qval)*sign(coeff))

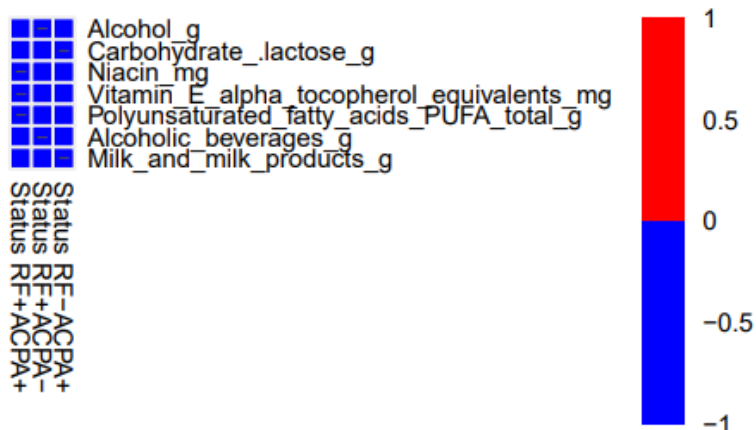


Рисунок 26 – MaAsLin2 статистически значимых нутриентов в зависимости от формы РА

Таким образом, у пациенток с РА, вне зависимости от формы заболевания, было достоверно снижено потребление алкоголя и алкогольных напитков, лактозы, ниацина, витамина Е, полиненасыщенных жирных кислот и молочных продуктов в сравнении со здоровым контролем, $\text{sign}(\text{coef})=-1$.

3.2.5 Клинические случаи пациенток РА с различными формами заболевания

Далее приведены клинические случаи РФ-положительного АЦЦП-положительного РА и РФ-положительного АЦЦП-негативного РА.

Клинический случай №1. Пациентка А, 32 года, казашка обратилась с жалобами на ноющие боли в пальцах обеих кистей, в локтевых, коленных и голеностопных суставах. Припухлость пальцев обеих кистей. Утреннюю

скованность в указанных суставах в течение полудня. Общую слабость. Периодическое повышение температуры до 37,8 С в течение 2-х недель.

Анамнез заболевания: пациентка считает себя больной с апреля 2018 г., когда впервые появились жалобы на ноющ боли, отек, скованность в пальцах обеих кистей, данные жалобы беспокоили в течение 1 месяца, затем самостоятельно купировались. Связывает с перенесенной ангиной, со слов часто болеет ангиной, повторно боли в суставах появились в ноябре 2018 года, тогда присоединились боли в суставах пальцев ног, обратилась за медицинской помощью, было назначено лечение, названия медикаментов не помнит, было назначено обследование, но пациентка не пошла повторно на прием. В марте 2019 г. пациентка упала, слезая с автобуса, повредила правое колено, появилась боль и припухлость данного сустава. Обратилась в Научный Институт Травматологии и Ортопедии г. Астана (Нұр-Сұлтан), был проведен артроцентез, была эвакуирована жидкость с правого коленного сустава, была наложена гипсовая повязка на 2 недели. Все данные со слов пациентки, сопроводительной документации нет. Со слов пациентки в течение 6 месяцев после вышеуказанной травмы присоединились боли в коленных, локтевых, плечевых суставах, в области лопаток и шейных позвонков. Самостоятельно использовала мази НПВС и периодически принимала НПВС в таблетках, с непродолжительным положительным эффектом. В связи с усилением болей в вышеуказанных суставах вновь обратилась за медицинской помощью.

Анамнез жизни: пациентка росла и развивалась соответственно полу и возрасту. Туберкулез и контакт с туберкулезными больными, вирусные гепатиты, венерические заболевания отрицает. Корью, краснухой не болела. Ветрянкой переболела в 2016 г. Эбштейн-Барр отрицает. Не состоит на Д-учете. Травмы: в 2018 г перелом правого голеностопа, в марте 2020 травма правого коленного сустава. Операций и гемотрансфузий не было. Псориаза нет. Хронический пиелонефрит в анамнезе.

Свой вес при рождении 3 кг.

Образование: среднее-специальное.

Профессия: официантка в кафе

Жилищно-бытовые условия: в частном доме с печным отоплением.

Семейное положение: замужем, 1 ребенок.

Вредные привычки: курит - 1 пачка в 2 дня в течение 2 лет, индекс курильщика 1, прием алкоголя – отрицает, прием наркотиков отрицает.

Аллергоанамнез: отягощен, имеется аллергия на мед

Наследственность по РА: у родной тети по линии матери ревматоидный полиартрит.

Наследственность по другим заболеваниям: у бабушки по материнской линии СД 2 типа.

Mensis с 13 лет, беременностей 3, родов 1, выкидыш 1, аборт 1

Контрацепция: барьерный метод

При объективном осмотре: Общее состояние относит удовлетворительное, Температура тела 36,8*. Рост 168 см. Вес 68 кг. ИМТ

25,3 кг/м². Нормостенического телосложения. Сознание ясное. Речь внятная. Кожные покровы обычной окраски. Высыпаний нет. Видимые слизистые обычной окраски. Периферических отёков нет. Гипотрофия мышц отсутствует. Периферические лимфоузлы не увеличены. По системам органов дыхания, сердечно-сосудистой, пищеварительной и мочевыделительной патологических изменений не выявлено.

При осмотре костно-суставной системы: боль при пальпации, активных и пассивных движениях, и симметричная припухлость проксимальных межфаланговых суставов (2-4 пальцы правой кисти, 3-4 пальцы левой кисти), боль в локтевых суставах, припухлость левого локтевого сустава, умеренная ограничение движений в локтевых суставах. Симптом поперечного сжатия кистей положительный, стоп отрицательный. Сила сжатия кистей сохранена. Боль при пальпации и активных движениях в коленных суставах, припухлость правого коленного сустава. Боль при пальпации голеностопных суставов, припухлости нет. На голени правой ноги визуализируется и пальпируется округлое плотное образование диаметром 0,5 см, безболезненное при пальпации. Деформация 1-го плюснефалангового сустава прав ноги Hallux Valgus. ЧБС 9, ЧПХ 7, оценка ВАШ- 7 баллов.

Пациентке было проведено анкетирование по опроснику оценки здоровья Health Assessment Questionnaire (HAQ), в результате получен балл 1,15- умеренное нарушение жизнедеятельности.

Результаты обследования:

Общий анализ крови: Гемоглобин – 114 г/л, Эритроциты – $4,02 \cdot 10^{12}$ /л, Цветной показатель – 0,85, Гематокрит – 35,0%, Средний объем эритроцита – 87,2 фл, Среднее содержание Hb в эритроците – 28,4 пг, Средняя концентрация Hb в эритроците – 325 г/л, Распределение эритроцитов по объему – 17,4 %, Тромбоциты – $307 \cdot 10^9$ /л, Тромбоциты – 0,237 %, Средний объем тромбоцита – 7,7 фл, Лейкоциты – $4,90 \cdot 10^9$ /л, Нейтрофилы – 57,9 %, Нейтрофилы (абс.кол-во) – $2,83 \cdot 10^9$ /л, Эозинофилы – 1,1%, Эозинофилы (абс.кол-во) – $0,05 \cdot 10^9$ /л, Базофилы – 0,39 %, Базофилы (абс.кол-во) – $0,019 \cdot 10^9$ /л, Моноциты – 7,7%, Моноциты (абс.кол-во) – $0,38 \cdot 10^9$ /л, Лимфоциты – 32,9%, Лимфоциты (абс.кол-во) – $1,61 \cdot 10^9$ /л, СОЭ (по Панченкову) – 41 мм/час, СОЭ (по Вестергрену) – 46 мм/час (снижение гемоглобина, снижение цветного показателя, снижение средней концентрации Hb в эритроците, повышение распределения эритроцитов по объему, ускорение СОЭ по Панченкову и Вестергрену)

Биохимический анализ крови: Общий белок - 77,10 г/л, Кретинин – 59,00 мкмоль/л, Глюкоза – 5,19 ммоль/л, АЛТ – 24,80 Ед/л, АСТ – 23,60 Ед/л, Ревматоидный фактор – 266,40 Ед/мл, С-реактивный белок – 17,6 мг/л, Холестерин – 4,37 ммоль/л, Антитела к циклическому цитрулиновому пептиду – 138,7 МЕ/мл (Повышение РФ, АЦЦП и СРБ)

Общий анализ мочи: Цвет – соломенно-желтый, Прозрачность – прозрачная, Относительная плотность - 1.016, Реакция - 6.0, Белок - не обнаружено, Глюкоза - не обнаружено, Билирубин - не обнаружено,

Уробилиноген - не обнаружено, Кетоны - не обнаружено, Нитриты - не обнаружено, Лейкоциты по полоске - не обнаружено, Эритроциты по полоске - не обнаружено (Общий анализ мочи без особенностей), (Микроскопическое исследование мочи без особенностей)

Диагностика аутоиммунных заболеваний: Антитела к компоненту SS – А (Ro) - >200.0 Ед/мл, Антитела к компоненту SS – В (La) – 35.40 Ед/мл

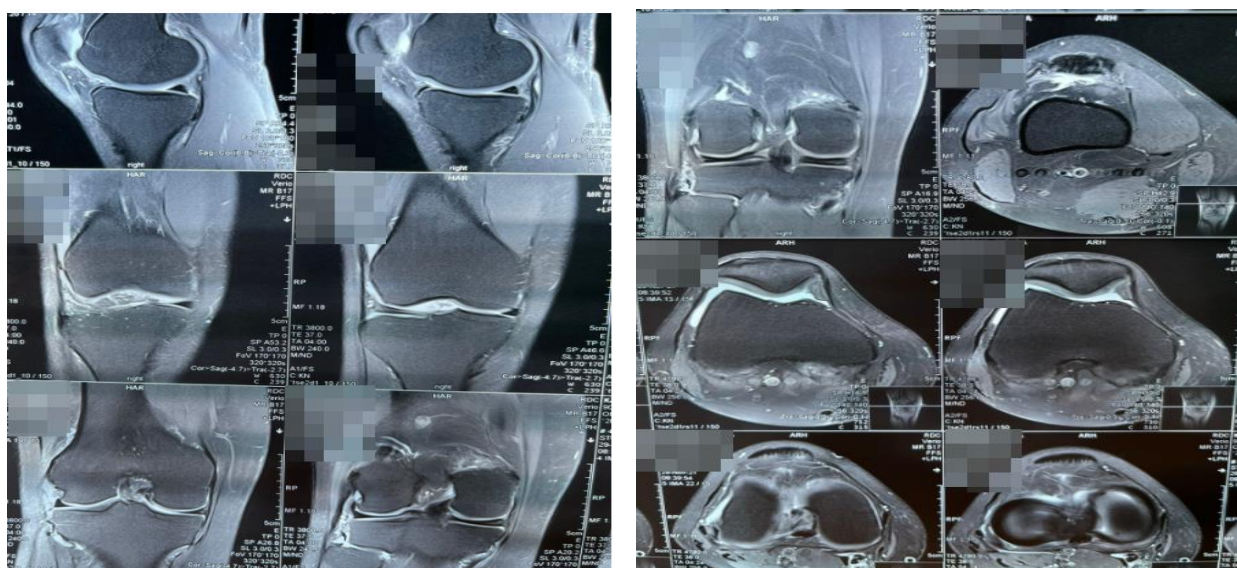
(Повышение антител к компоненту SS – А и SS – В)

Электрофорез белков (белковые фракции): Альбумин - 50,9%, Альфа 1 - 4,1%, Альфа 2 - 10,5%, Бета 1 - 5,6%, Бета 2 - 5,6%, Гамма - 23,3%.

(Гипоальбуминемия, гипергаммаглобулинемия)

Рентгенография кистей: на рентгенограмме в прямой проекции обеих кистей с захватом лучезапястных суставов признаки околоуставного остеопороза.

МРТ правого коленного сустава: МРТ-картина соответствует II стадии артрита правого коленного сустава (рисунок 27).



а

б

а – общий снимок; б – отдельный снимок

Рисунок 27 – Магнитно-резонансная томография правого коленного сустава пациентки А

Диагноз пациентки, выставленный на основании критериев ACR и EULAR 2010 года [137, р. 2575]:

Ревматоидный артрит. РФ-позитивный. Суставная форма. Ранняя стадия. Активность III (DAS28-6,08). Ревматоидные узелки. Р-стадия 0-I. АЦЦП позитивный. ФНС II.

Halux Valgus правой стопы. Железододефицитная анемия, легкой степени тяжести. Хронический пиелонефрит в стадии ремиссии. ХБП0.

Результат генетического анализа: HLA-DRB9-rs9268839 (G/G), CD28-rs1980422 (C/T), CTLA4-rs3087243 (A/G), FCRL3-rs2317230 (G/T), LBH-rs10175798 (A/G), PADI4-rs2240340 (C/T).

Далее представлены результаты анализа микробиома ротовой полости (рисунок 28) и кишечника (рисунок 29) данной пациентки

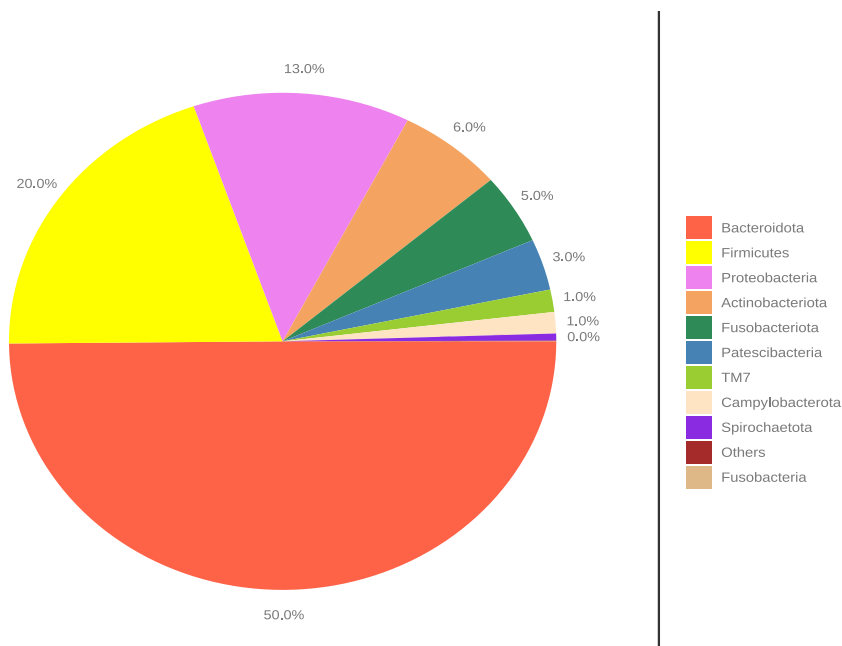


Рисунок 28 – Результаты исследования микробиоценоза ротовой полости пациентки А

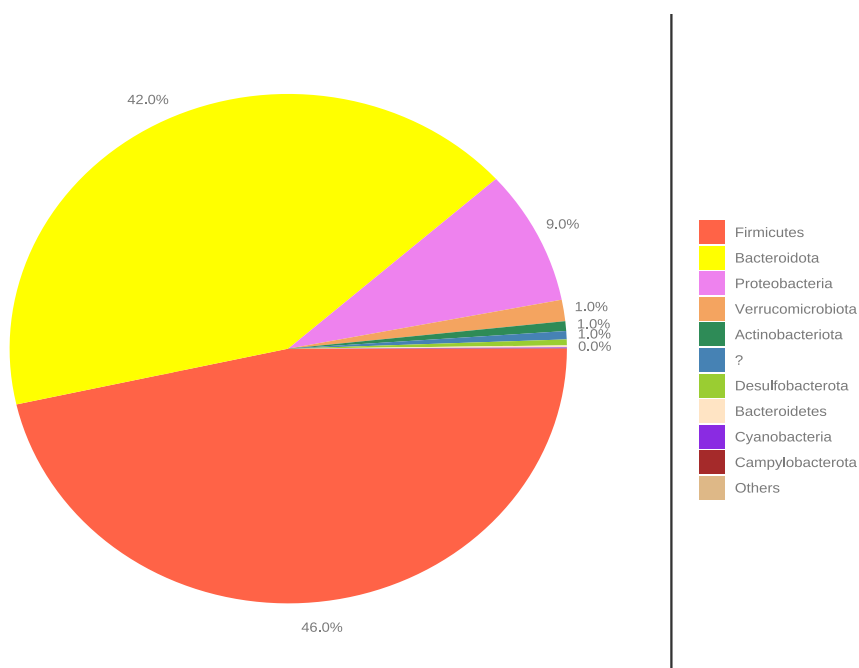


Рисунок 29 – Результаты исследования микробиоценоза кишечника пациентки А

Данный клинический случай является наглядным примером классической картины РФ-позитивного АЦЦП-позитивного РА высокой активности у пациента женского пола, казахской этнической принадлежности, детородного возраста, имеющей в анамнезе доказанный провоцирующий фактор как курение, а также наследственный фактор, более того у данной пациентки обнаружены замена аллелей в генотипах SNP HLA-DRB9-rs9268839, CD28-rs1980422, CTLA4-rs3087243, FCRL3-rs2317230, LBH-rs10175798, PADI4-rs2240340. С преобладанием Bacteroidota в микробиоме ротовой полости 50%, и практически одинаковым соотношением в микробиоме кишечника Firmicutes 46% и Bacteroidota 42%. При анализе энтеротипов у данной пациентки установлен энтеротип Prevotella.

Клинический случай №2. Пациентка Б, 36 лет, казашка обратилась с жалобами на общую слабость, быструю утомляемость, на периодические ноющие боли в левом плечевом, локтевых суставах, лучезапястных суставах, проксимальных межфаланговых суставах 2-3 пальца левой кисти, утренняя скованность в руках до 2 часов, хруст в суставах.

Анамнез заболевания: Считает себя больной с декабря 2018.г, когда впервые появились боли в плечевых суставах, связывает со стрессом, обратилась за мед помощью, была осмотрена ревматологом, обследована, выявилось повышение РФ, выставлен д/з: ревматоидный артрит, назначено лечение: НПВС, ГКС, Методжект 10 мг раз в нед., получала 3 мес., затем самостоятельно прекратила прием Методжекта, боли в суставах сохранялись, вновь обратилась за мед помощью, был вновь назначен Методжект 10 мг п/к раз в нед, пациентка не отмечает положительного эффекта. Из за не эффективности метотрексата и плохой непереносимости, был назначен лефлуномид, принимает месяц, без эффекта.

Анамнез жизни: росла и развивалась соответственно полу и возрасту. Туберкулез и контакт с туб. больными, вирусные гепатиты, вен. заболевания отрицает. Корью, краснухой не болела, ветрянка в детстве. Состоит на Д-учете у отоларинголога с д/з Хронический отит. Травм не было. Операция на левое ухо в 2006г. Гемотрансфузий не было.

Свой вес при рождении 3 кг 200 гр.

Профессия: домохозяйка.

Образование: высшее.

Профессия: домохозяйка.

Жилищно-бытовые условия: живет в частном доме с печным отоплением.

Семейное положение: замужем, 4 детей.

Вредные привычки: курение - отрицает, алкоголь – отрицает, прием наркотиков отрицает.

Аллергоанамнез: непереносимости лекарственных препаратов и пищевых продуктов не отмечает.

Наследственность по СД, БА, онкологи отрицает.

Наследственность по РА неотягощена.

Mensis с 13 лет регулярные, беременностей 5, родов 4, замершая беременность 1 в 2007.

Контрацепция: ВМС.

Объективный статус: Общее состояние неудовлетворительное за счет выраженного болевого суставного синдрома. Температура тела 36,8*. Рост 162 см. Вес 58 кг. ИМТ 22,1 кг/м². Сознание ясное. Речь внятная. Кожные покровы обычной окраски. Высыпаний нет. Видимые слизистые обычной окраски. Периферических отёков нет. Гипотрофия мышц отсутствует.

Система органов дыхания. Дыхание через нос свободное. ЧД 18 в минуту. Форма грудной клетки обычная. Перкуторный звук над лёгочными полями лёгочный. При аускультации дыхание везикулярное, хрипы не выслушиваются.

Сердечно-сосудистая система. Пульс симметричный 72 удара в минуту, удовлетворительного наполнения, ритмичный. АД 120/80 мм.рт.ст., сердечные тоны звучные. ЧСС 72 уд. в мин. Перкуторно границы сердца не расширены. Патологические шумы не выслушиваются.

Система пищеварения. Язык влажный, обложен белым налётом. Живот мягкий, безболезненный при пальпации. Печень по краю реберной дуги, не увеличена. Селезенка перкуторно не увеличена. Стул - склонность к запорам.

Система мочеотделения. Мочеиспускание нормальное. Симптом поколачивания отрицателен с обеих сторон.

Костно-суставная система. Снижение силы сжатия кистей. Симптом поперечного сжатия кисти слева положительный, справа отрицательный, симптом поперечного сжатия стоп отрицательный. Болезненность левого плечевого сустава, локтевых, лучезапястных суставов, проксимального межфалангового сустава 2 и 3 пальца левой кисти. ЧБС 7, ЧПХ 0, оценка ВАШ – 5 баллов. Пациентке было проведено анкетирование по опроснику оценки здоровья Health Assessment Questionnaire (HAQ), в результате получен балл 0,5-минимальное нарушение жизнедеятельности.

Результаты обследования:

Общий анализ крови: Гемоглобин – 120 г/л, Эритроциты – $3,75 \cdot 10^{12}$ /л, Цветной показатель – 0,96, Гематокрит – 35,8%, Средний объем эритроцита – 95,4 фл, Среднее содержание Нв в эритроците – 32 пг, Средняя концентрация Нв в эритроците – 336 г/л, Распределение эритроцитов по объему – 14,2%, Тромбоциты – $271 \cdot 10^9$ /л, Тромбокрит – 0,215%, Средний объем тромбоцита – 7,9 фл, Лейкоциты – $3,70 \cdot 10^9$ /л, Нейтрофилы – 71,4%, Нейтрофилы (абс. кол-во) – $2,65 \cdot 10^9$ /л, Эозинофилы – 2,1%, Эозинофилы (абс. кол-во) – $0,08 \cdot 10^9$ /л, Базофилы – 0,74%, Базофилы (абс. кол-во) – $0,027 \cdot 10^9$ /л, Моноциты – 7,7%, Моноциты (абс. кол-во) – $0,29 \cdot 10^9$ /л, Лимфоциты – 18,1%, Лимфоциты (абс. кол-во) – $0,67 \cdot 10^9$ /л, СОЭ (по Панченкову) – 46 мм/час, СОЭ (по Вестергрену) – 51 мм/час (умеренное снижение эритроцитов, умеренное снижение лейкоцитов ускорение СОЭ по Панченкову и Вестергрену).

Биохимический анализ крови: Общий белок - 76,50 г/л, Креатинин – 44,00 мкмоль/л, Глюкоза – 5,12 ммоль/л, АЛТ – 6,90 Ед/л, АСТ – 19,40 Ед/л, Ревматоидный фактор – 91,90 Ед/мл, С-реактивный белок – 2,1 мг/л,

Холестерин – 4,03 ммоль/л, Антитела к циклическому цитрулиновому пептиду – < 0.5 МЕ/мл (Повышение РФ).

Общий анализ мочи: Цвет – соломенно-желтый, Прозрачность – прозрачная, Относительная плотность - 1.005 Реакция - 6.0, Белок - не обнаружено, Глюкоза - не обнаружено, Билирубин - не обнаружено, Уробилиноген - не обнаружено, Кетоны - не обнаружено, Нитриты - не обнаружено, Лейкоциты по полоске - не обнаружено, Эритроциты по полоске - не обнаружено (Общий анализ мочи без особенностей) (Микроскопическое исследование мочи без особенностей).

Диагностика аутоиммунных заболеваний: Антитела к компоненту SS – A (Ro) - > 39,80 Ед/мл, Антитела к компоненту SS – B (La) – 39,8Ед/мл (Повышение антител к компоненту SS – A(Ro))

Электрофорез белков (белковые фракции): Альбумин – 49,7%, Альфа 1 – 3,7%, Альфа 2 – 8,4%, Бета 1 – 5,8%, Бета 2 – 5,2%, Гамма – 27,2% (Гипоальбуминемия, гипергаммаглобулинемия)

Рентгенография кистей: на рентгенограмме в прямой проекции обеих кистей с захватом лучезапястных суставов костно-суставная структура сохранена (рисунок 30).



Рисунок 30 – Рентгенография кистей в прямой проекции обеих кистей с захватом лучезапястных суставов пациентки Б

Диагноз пациентки, выставленный на основании критериев ACR и EULAR 2010 года [137, р. 2575]:

Д/з: Ревматоидный артрит. Серопозитивный, суставная форма, развернутая стадия, активность 2 (DAS28-5,07). Р ст-1. ФНС 2. АЦЦП негативный.

Результаты генетического анализа: CD28-rs1980422 (C/T), LINC01104-rs9653442 (C/T), PTPN22-rs2476601b (A/G), RASGRP1-rs8032939 (C/T), STAT4-rs11889341 (C/T), SYNGR1-rs909685(A/T), PADI4-rs2240340 (C/T).

Далее представлены результаты анализа микробиома ротовой полости (рисунок 31) и кишечника (рисунок 32) данной пациентки.

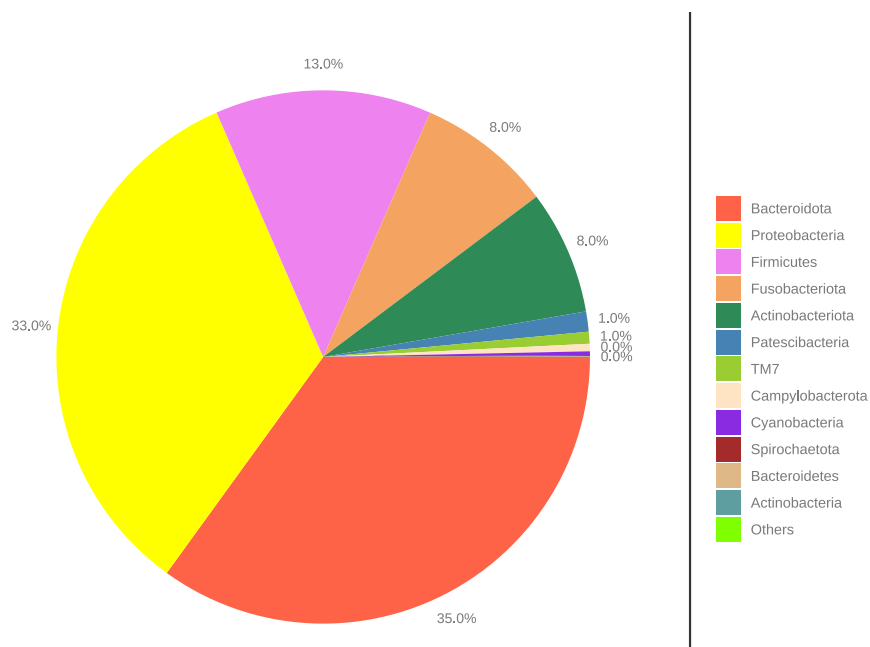


Рисунок 31 – Результат исследования микробиоценоза ротовой полости пациентки Б

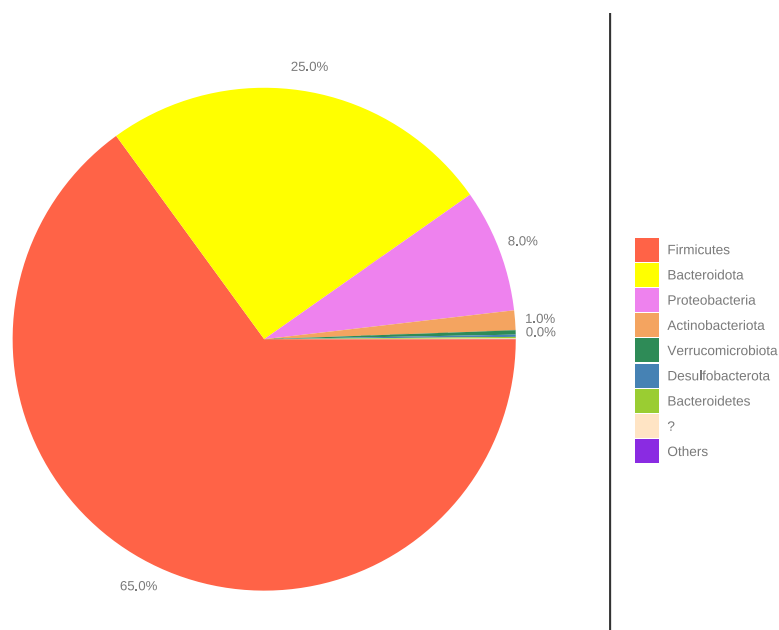


Рисунок 32 – Результаты исследования микробиоценоза кишечника пациентки Б

Данный клинический случай является наглядным примером РФ-позитивного АЦЦП-негативного РА высокой активности у пациента женского пола казахской этнической принадлежности, детородного возраста, имеющей в анамнезе провоцирующий фактор стресс, у данной пациентки обнаружены замена аллелей в генотипах SNP CD28-rs1980422 (C/T), LINC01104-rs9653442 (C/T), PTPN22-rs2476601b (A/G), RASGRP1-rs8032939 (C/T), STAT4-rs11889341 (C/T), SYNGR1-rs909685(A/T), PADI4-rs2240340 (C/T). С практически равным количеством в микробиоме ротовой полости Bacteroidota 35% и Proteobacteria 32%, в микробиоме кишечника преобладал Firmicutes 65%. При анализе энтеротипов у данной пациентки установлен энтеротип Ruminococcus.

3.3 Изучение генетических особенностей ревматоидного артрита

Был проведен сравнительный анализ частот 17 генотипов между пациентками с РА и контрольной группой. Все образцы были генотипированы на HLA-DRB9-rs9268839, CD28-rs1980422, CD40-rs4810485, COG6-rs9603616, CTLA4-rs3087243, ETS1-rs73013527, FCRL3-rs2317230, LINC01104-rs9653442, LBH-rs10175798, PADI2-rs761426, PADI4-rs2240340a, PTPN22-rs2476601b, RASGRP1-rs8032939, STAT4-rs11889341, SYNGR1-rs909685, TAGAP-rs2451258, TRAF1-rs3761847.

В исследуемую группу были включены 70 пациентов из основной выборки, все женщины, с диагнозом РА со средним возрастом 47 лет (Q1–Q3:39-51). Стратификация выборки по типу заболевания показала, что 74,2% (n=52) женщин, участвовавших в исследовании, были РФ-позитивными, в то время как 25,8% (n=18) были РФ-негативными. У 51,4% (n=36) был АЦЦП-положительный и у 48,6% (n=34) АЦЦП-отрицательный вариант заболевания. Все клинические и биологические характеристики пациенток, включенных в это исследование, представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Характеристика пациенток с РА, включенных в генетическое исследование

Параметры	Число пациентов (n = 70)
1	2
Средний возраст (лет)	47 (Q1–Q3: 39–51)
Возраст начала РА	34,5 (Q1–Q3: 26–43)
Продолжительность заболевания (годы)	6 (Q1–Q3: 3–12)
DAS28	4,6 ± 1,5 (95% CI: 4,4–5,1)
HAQ	0,9 ± 0,7 (95% CI: 0,8 –1,2)
РФ (МЕ/мл)	5,1 (Q1–Q3: 14,4 –115,1)
АЦЦП(Ед/мл)	33,4 (Q1–Q3: 0,5 –163,3)
СРБ (мг/л)	4,1 (Q1–Q3: 0,9 –7,7)
СОЭ(мм/ч)	23,5 (Q1–Q3: 14–46)
РФ-позитивный (%)	53 (75,7%)
АЦЦП-позитивный (%)	36 (51,4%)
Курильщики	3 (4,2%)
Рентген стадия	
I	14 (20%)

Продолжение таблицы 22

1	2
II	30 (42,8%)
III	16 (22,8%)
IV	10 (14,2%)
Функциональный класс	
I	19 (27,1%)
II	42 (60%)
III	8 (11,4%)
IV	1(1,4%)
Активность заболевания	
Высокая	27 (38,5%)
Средняя	32 (45,7%)
Низкая	6 (8,5%)
Ремиссия	5 (7,1%)

В контрольную группу вошли 113 женщин из основной выборки, сопоставимые с основной группой, со средним возрастом 39 лет (Q1-Q3: 35-47,5) без индивидуальной или семейной истории аутоиммунных заболеваний.

При анализе данных для выявления значимых SNP между основной и контрольной группой с помощью Манхэттен графика, было выявлено преобладание HLA-DRB9-rs9268839 в кодоминантной, рецессивной, лог-адитивной моделях наследования. Остальные 16 SNP не показали статистически значимых различий по всем моделям наследования (рисунок 33).

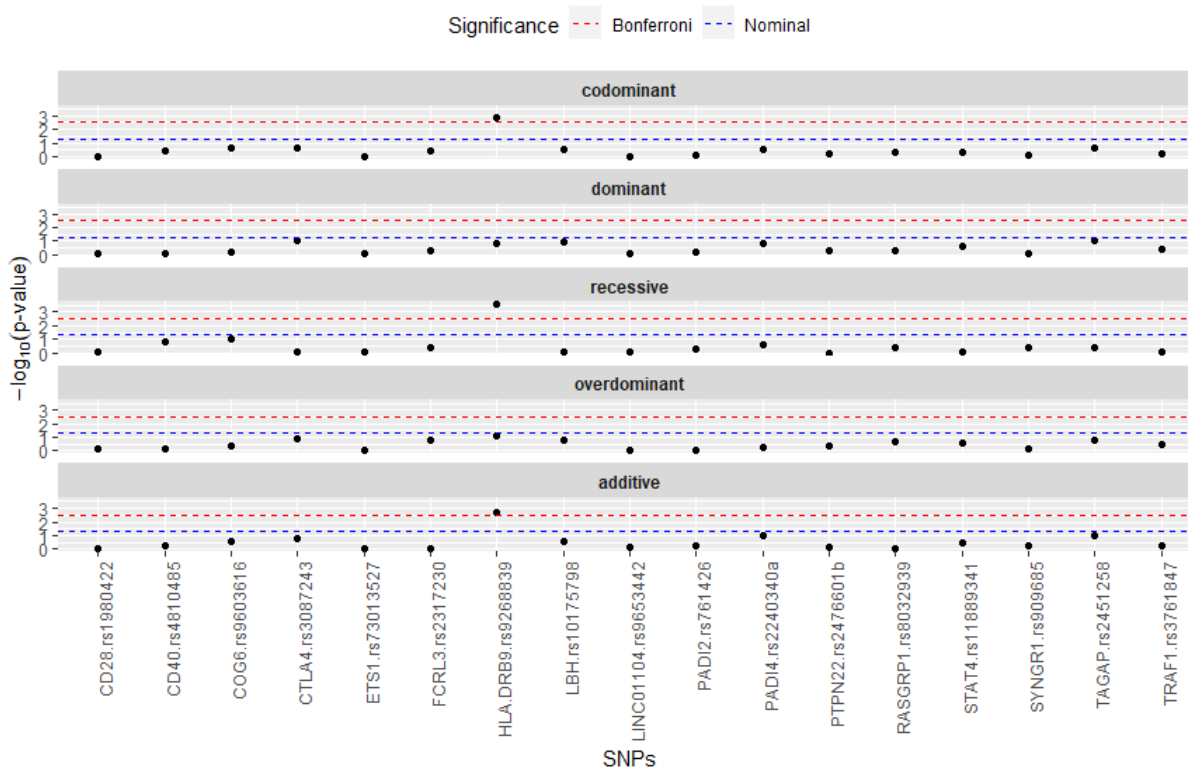


Рисунок 33 – Манхэттенский график распределения 17 SNP по пяти моделям наследования в основной и контрольной группе

Далее все 17 SNP были проверены по равновесию Харди-Вайнберга, представленному на рисунке таблица 23.

Таблица 23 – Анализ независимости выборки по нуклеотидам согласно равновесию Харди-Вайнберга

SNP	Аллели	MAF	HWE
CD28-rs1980422	T/C	87,6	1
CD40-rs4810485	G/T	80,5	1
COG6-rs9603616	C/T	71,9	0,067134
CTLA4-rs3087243	G/A	65,1	1
ETS1-rs73013527	C/T	65,7	0,191484
FCRL3-rs2317230	G/T	55,7	0,456789
HLA-DRB9-rs9268839	A/G	52,7	0,461691
LBH-rs10175798	A/G	55,7	0,456789
LINC01104-rs9653442	T/C	60,8	0,355108
PADI2-rs761426	T/A	65,4	0,415812
PADI4-rs2240340a	C/T	58,4	0,132607
PTPN22-rs2476601b	G/A	93	1
RASGRP1-rs8032939	C/T	51,1	0,769593
STAT4-rs11889341	C/T	68,6	1
SYNGR1-rs909685	A/T	61,9	0,119166
<i>TAGAP-rs2451258</i>	<i>T/C</i>	<i>81,9</i>	<i>0,022431*</i>
TRAF1-rs3761847	A/G	56,2	0,550284

* – статистически значимый результат

По результатам проверки 17 нуклеотидов по равновесию Харди-Вайнберга, нуклеотид TAGAP-rs2451258 был статистически значим, что означает отсутствие независимости между образцами, в связи с чем данный нуклеотид был исключен из дальнейшего анализа.

Согласно данным, представленным в таблице 24, G аллель гена HLA-DRB9-rs9268839 значительно преобладал в группе РА по сравнению с контрольной группой, составляя 57,9% и 41,2% пациенток с РА и контроля, соответственно, ($p=0,0025$), (таблица 24).

Таблица 24 – Распределение аллелей HLA-DRB9 в основной и контрольной группе

SNP	Аллель	РА (n=70), (abs.%)	Контроль (n=113), (abs. %)	ОШ (95% ДИ)	p
<i>rs9268839</i> <i>HLA-DRB9</i>	A	59 (42,1%)	133 (58,8%)	1,96 (1,252–3,081)	0,0025*
	G	81 (57,9%)	93(41,2%)		

* – статистически значимый результат

Далее проведен анализ распределения генотипов, который подтвердил статистически значимые различия в носительстве гена HLA-DRB9-rs9268839, (таблица 25).

Таблица 25 – Распределение генотипов HLA-DRB9 в основной и контрольной группе

HLA-DRB9- (rs9268839)	РА (n=70)	%	Контроль (n=113)	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
A/A	16	22,9	37	32,7	1		0,00162*	238,1
A/G	27	38,6	59	52,2	1,06	0,5-2,22		
G/G	27	38,6	17	15	3,67	1,58-8,54		
Dominant								
A/A	16	22,9	37	32,7	1		0,14773	247,2
A/G-G/G	54	77,1	76	67,3	1,64	0,83-3,25		
Recessive								
A/A-A/G	43	61,4	96	85	1		0,00034*	236,1
G/G	27	38,6	17	15	3,55	1,75-7,18		
Overdominant								
A/A-G/G	43	61,4	54	47,8	1		0,07145	246,2
A/G	27	38,6	59	52,2	0,57	0,31-1,05		
log-Additive								
0,1,2	70	38,3	113	61,7	1,92	1,25-2,96	0,00232*	239,7
* – статистически значимый результат								

Так, генотип G/G HLA-DRB9-rs9268839 достоверно преобладал в группе пациенток с РА по сравнению с контрольной группой по кодоминантной модели ОШ = 3,67 [95% ДИ 1,58–8,54], p = 0,00162 и рецессивной модели, ОШ = 3,55 [95% ДИ 1,75–7,18], p = 0,00034 (таблица 24).

Лог-аддитивная модель также выявила значительные различия в генотипах между пациентками с РА и контрольными группами ОШ = 1,92 [95% ДИ 1,25–2,96], p = 0,00232, (таблица 24).

Таким образом, G/G HLA-DRB9-rs9268839 увеличивает шансы развития РА в 3,67 раз согласно кодоминантной модели и в 3,55 раз согласно рецессивной модели наследования.

Далее представлен анализ распределения 15 единичных нуклеотидных полиморфизмов в основной и контрольной группах исследования. Частоты генотипов CD28-rs1980422, CD40-rs4810485, COG6-rs9603616, CTLA4-rs3087243, ETS1-rs73013527, FCRL3-rs2317230, LINC01104-rs9653442, LBH-rs10175798, PADI2-rs761426, PADI4-rs2240340a, PTPN22-rs2476601b, RASGRP1-rs8032939, STAT4-rs11889341, SYNGR1-rs909685, TRAF1-rs3761847 не продемонстрировали статистически значимых различий между основной и контрольной группой во всех пяти моделях наследования (p > 0,005), (таблица 26).

Таблица 26 – Распределение генотипов единичных нуклеотидных полиморфизмов, не показавших статистически значимые различия в основной и контрольной группе исследования

Распределение генотипов								
1								
CD28- rs1980422	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95% ДИ	p	AIC
Codominant								
T/T	53	75,7	88	77,9	1		0,94117	251,3
C/T	16	22,9	23	20,4	0,89	0,44-1,83		
C/C	1	1,4	2	1,7	1,19	0,11-13,45		
Dominant								
T/T	53	75,7	88	77,9	1		0,79378	249,3
C/T-C/C	17	24,3	25	21,1	0,91	0,45-1,83		
Recessive								
T/T-C/T	69	98,6	111	98,3	1		0,87006	249,4
C/C	1	1,4	2	1,7	1,22	0,11-13,72		
Overdominant								
T/T-C/C	54	77,1	90	79,6	1		0,75072	249,3
C/T	16	22,9	23	20,4	0,89	0,43-1,82		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,94	0,5-1,77	0,84762	249,4
COG6- rs9603616								
РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC	
Codominant								
C/C	37	52,9	63	55,7	1		0,24584	248,6
C/T	22	31,4	41	36,3	1,1	0,57-2,13		
T/T	11	15,7	9	8,0	0,47	0,18-1,25		
Dominant								
C/C	37	52,9	63	55,7	1		0,71124	249,3
C/T-T/T	33	47,1	50	44,3	0,89	0,49-1,62		
Recessive								
C/C-C/T	59	84,3	104	92,0	1		0,09916	246,7
T/T	11	15,7	9	8,0	0,46	0,18-1,16		
Overdominant								
C/C-T/T	48	68,6	72	63,7	1		0,47858	248,9
C/T	22	31,4	41	36,3	1,26	0,67-2,36		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,8	0,52-1,23	0,30186	248,3
CD40- rs4810485								
РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC	
Codominant								
G/G	46	65,7	73	64,6	1		0,36776	249,4
G/T	23	32,9	34	30,1	0,95	0,5-1,8		
T/T	1	1,4	6	5,3	3,73	0,43-31,98		
Dominant								
G/G	46	65,7	73	64,6	1		0,85012	249,4

Продолжение таблицы 26

1								
G/T-T/T	24	34,3	40	35,4	1,06	0,57-1,98		
Recessive								
G/G-G/T	69	98,6	107	94,7	1		0,16024	247,4
T/T	1	1,4	6	5,3	3,8	0,45-32,23		
Overdominant								
G/G-T/T	47	67,1	79	69,9	1		0,73093	249,3
G/T	23	32,9	34	30,1	0,89	0,47-1,69		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	1,18	0,69-2,03	0,54166	249
CTLA4- rs3087243	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
G/G	35	50	42	37,2	1		0,22384	248,4
A/G	27	38,6	57	50,4	1,75	0,92-3,31		
A/A	8	11,4	14	12,4	1,42	0,54-3,78		
Dominant								
G/G	35	50	42	37,2	1		0,09264	246,6
A/G-A/A	35	50	71	62,8	1,67	0,92-3,06		
Recessive								
G/G-A/G	62	88,6	99	87,6	1		0,87899	249,4
A/A	8	11,4	14	12,4	1,07	0,43-2,71		
Overdominant								
G/G-A/A	43	61,4	56	49,6	1		0,11524	246,9
A/G	27	38,6	57	50,4	1,62	0,89-2,97		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	1,35	0,86-2,13	0,18619	247,7
ETS1- rs73013527	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
C/C	31	44,3	52	46,0	1		0,97174	251,4
C/T	29	41,4	45	39,8	0,93	0,49-1,76		
T/T	10	14,3	16	14,2	0,94	0,38-2,32		
Dominant								
C/C	31	44,3	52	46,0	1		0,81132	249,4
C/T-T/T	39	55,7	61	54,0	0,93	0,51-1,69		
Recessive								
C/C-C/T	60	85,7	98	86,8	1		0,94365	249,4
T/T	10	14,3	16	14,2	0,97	0,41-2,27		
Overdominant								
C/C-T/T	41	58,6	68	60,2	1		0,84785	249,4
C/T	29	41,4	45	39,8	0,94	0,51-1,73		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,96	0,63-1,46	0,83879	249,4
FCRL3- rs2317230	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								

Продолжение таблицы 26

1								
G/G	25	35,7	34	30,1	1		0,37735	249,5
G/T	28	40	57	50,4	1,48	0,75-2,93		
T/T	17	24,3	22	19,5	0,92	0,41-2,09		
Dominant								
G/G	25	35,7	34	30,1	1		0,45823	248,9
G/T-T/T	45	64,3	79	69,9	1,27	0,68-2,38		
Recessive								
G/G-G/T	53	75,7	92	80,5	1		0,40733	248,7
T/T	17	24,3	22	19,5	0,74	0,36-1,51		
Overdominant								
G/G-T/T	42	60	56	49,6	1		0,16658	247,5
G/T	28	40	57	50,4	1,53	0,84-2,79		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	1	0,66-1,51	0,99095	249,4
LBH-rs10175798	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
A/A	18	25,7	41	36,3	1		0,13530	249,5
A/G	37	52,9	48	42,5	0,66	0,38-1,4		
G/G	15	21,4	24	21,2	0,97	0,45-2,1		
Dominant								
A/A	18	25,7	41	36,3	1		0,12430	247
A/G-G/G	52	74,3	72	63,7	0,6	0,31-1,16		
Recessive								
A/A-A/G	55	78,6	89	78,8	1		0,92802	249,4
G/G	15	21,4	24	21,2	0,97	0,47-2		
Overdominant								
A/A-G/G	33	47,1	65	57,5	1		0,17533	247,6
A/G	37	52,9	48	42,5	0,66	0,36-1,2		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,8	0,53-1,21	0,29954	248,3
LINC01104-rs9653442	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
T/T	24	34,3	40	35,4	1		0,96431	251,3
C/T	36	51,4	58	51,3	0,96	0,5-1,84		
C/C	10	14,3	15	13,3	0,88	0,34-2,26		
Dominant								
T/T	24	34,3	40	35,4	1		0,85012	249,4
C/T-C/C	46	65,7	73	64,6	0,94	0,5-1,76		
Recessive								
T/T-C/T	60	85,7	98	86,7	1		0,81111	249,4
C/C	10	14,3	15	13,3	0,9	0,38-2,13		
Overdominant								
T/T-C/C	34	48,6	55	48,7	1		0,98691	249,4

Продолжение таблицы 26

1								
C/T	36	51,4	58	51,3	1	0,55-1,8		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,94	0,6-1,47	0,79532	249,3
PADI2- rs761426	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
T/T	30	42,9	45	39,8	1		0,81440	251
A/T	34	48,6	55	48,7	1,07	0,57-2,01		
A/A	6	8,6	13	11,5	1,41	0,48-4,12		
Dominant								
T/T	30	42,9	45	39,8	1		0,70187	249,3
A/T-A/A	40	57,1	68	60,2	1,12	0,62-2,06		
Recessive								
T/T-A/T	64	91,4	100	88,5	1		0,54817	249
A/A	6	8,6	13	11,5	1,36	0,49-3,76		
Overdominant								
T/T-A/A	36	51,4	58	51,3	1		0,98691	249,4
A/T	34	48,6	55	48,7	1	0,55-1,82		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	1,14	0,72-1,82	0,56803	249,1
PADI4- rs2240340	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
C/C	21	30	46	40,7	1		0,27151	248,8
C/T	32	45,7	47	41,6	0,67	0,34-1,33		
T/T	17	24,3	20	17,7	0,53	0,23-1,2		
Dominant								
C/C	21	30	46	40,7	1		0,13435	247,2
C/T-T/T	49	70	67	59,3	0,62	0,33-1,17		
Recessive								
C/C-C/T	53	75,7	93	82,3	1		0,25952	248,1
T/T	17	24,3	20	17,7	0,66	0,32-1,36		
Overdominant								
C/C-T/T	38	54,3	66	58,4	1		0,59686	249,1
C/T	32	45,7	47	41,6	0,85	0,47-1,55		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,72	0,48-1,08	0,11075	246,9
PTPN22- rs2476601	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
G/G	59	84,3	100	87,5	1		0,68884	249,8
A/G	11	15,7	12	11,6	0,69	0,29-1,64		
A/A	0	0	1	0,9		0		
Dominant								
G/G	59	84,3	100	87,5	1		0,49781	248,9
A/G-A/A	11	15,7	12	12,5	0,74	0,32-1,74		

Продолжение таблицы 26

1								
Recessive								
G/G-A/G	70	100	12	99,1	1		1	248,5
A/A	0	0	1	0,9		0		
Overdominant								
G/G-A/A	59	84,3	101	88,4	1		0,39114	248,7
A/G	11	15,7	12	11,6	0,68	0,29-1,62		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,82	0,37-1,83	0,68884	249,2
RASGRP1- rs8032939	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
C/C	16	22,9	30	26,5	1		0,46346	249,9
C/T	40	57,1	54	47,8	0,71	0,34-1,47		
T/T	14	20	29	25,7	1,07	0,44-2,57		
Dominant								
C/C	16	22,9	30	26,5	1		0,53251	249
C/T-T/T	54	77,1	83	73,5	0,8	0,4-1,61		
Recessive								
C/C-C/T	56	80	84	74,3	1		0,41175	248,7
T/T	14	20	29	25,7	1,35	0,66-2,77		
Overdominant								
C/C-T/T	30	42,9	59	52,2	1		0,21825	247,9
C/T	40	57,1	54	47,8	0,69	0,38-1,25		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	1,02	0,67-1,57	0,91574	249,4
STAT4- rs11889341	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
C/C	29	41,4	57	50,5	1		0,47218	249,9
C/T	34	48,6	45	39,8	0,68	0,36-1,27		
T/T	7	10	11	9,7	0,79	0,28-2,24		
Dominant								
C/C	29	41,4	57	50,5	1		0,23314	248
C/T-T/T	41	58,6	56	49,5	0,7	0,38-1,27		
Recessive								
C/C-C/T	63	90	102	90,3	1		0,92302	249,4
T/T	7	10	11	9,7	0,95	0,35-2,58		
Overdominant								
C/C-T/T	36	51,4	68	60,2	1		0,25428	248,1
C/T	34	48,6	45	39,8	0,71	0,39-1,28		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,8	0,51-1,26	0,34249	248,5
SYNGR1- rs909685	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
A/A	28	40	47	41,6	1		0,75167	250,8

Продолжение таблицы 26

1								
A/T	28	40	48	42,5	1,02	0,53-1,97		
T/T	14	20	18	15,9	0,75	0,32-1,74		
Dominant								
A/A	28	40	47	41,6	1		0,81551	249,4
A/T-T/T	42	60	66	58,4	0,93	0,51-1,7		
Recessive								
A/A-A/T	56	80	95	84,1	1		0,45139	248,8
T/T	14	20	18	15,9	0,74	0,34-1,61		
Overdominant								
A/A-T/T	42	60	65	57,5	1		0,72680	249,3
A/T	28	40	48	42,5	1,11	0,61-2,04		
log-Additive								
0,1,2	70	37,8	113	62,2	0,89	0,59-1,34	0,58066	249,1
TRAF1- rs3761847	РА n=70	%	Контроль n=113	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
A/A	24	34,3	31	27,4	1		0,57111	250,3
A/G	33	47,1	62	54,9	1,43	0,73-2,82		
G/G	13	18,6	20	17,7	1,15	0,48-2,77		
Dominant								
A/A	24	34,3	31	27,7	1		0,35565	248,6
A/G-G/G	46	65,7	82	72,3	1,35	0,71-2,57		
Recessive								
A/A-A/G	57	81,4	93	82,3	1		0,83918	249,4
G/G	13	18,6	20	17,7	0,92	0,43-2		
Overdominant								
A/A-G/G	37	52,9	51	45,1	1		0,31310	
A/G	33	47,1	62	54,9	1,36	0,75-2,46		
log-Additive								
0,1,2	0,1,2	0,1,2	0,1,2	0,1,2	0,1,2	0,1,2	0,1,2	0,1,2

В результате дальнейшего анализа не было выявлено статистически значимых ассоциаций нуклеотида HLA-DRB9-rs9268839 с клиническими проявлениями и лабораторными данными.

Далее нами был проведен анализ частот генотипов 17 SNP между пациентками с РФ-позитивной и РФ-негативной формами РА (рисунок 34). По результатам Манхэттонского графика, при сравнении РФ-позитивной и РФ – негативной форм заболевания в пяти моделях наследования значимые различия продемонстрировали нуклеотиды SYNGR1-rs909685 и RASGRP1-rs8032939 (рисунок 34).

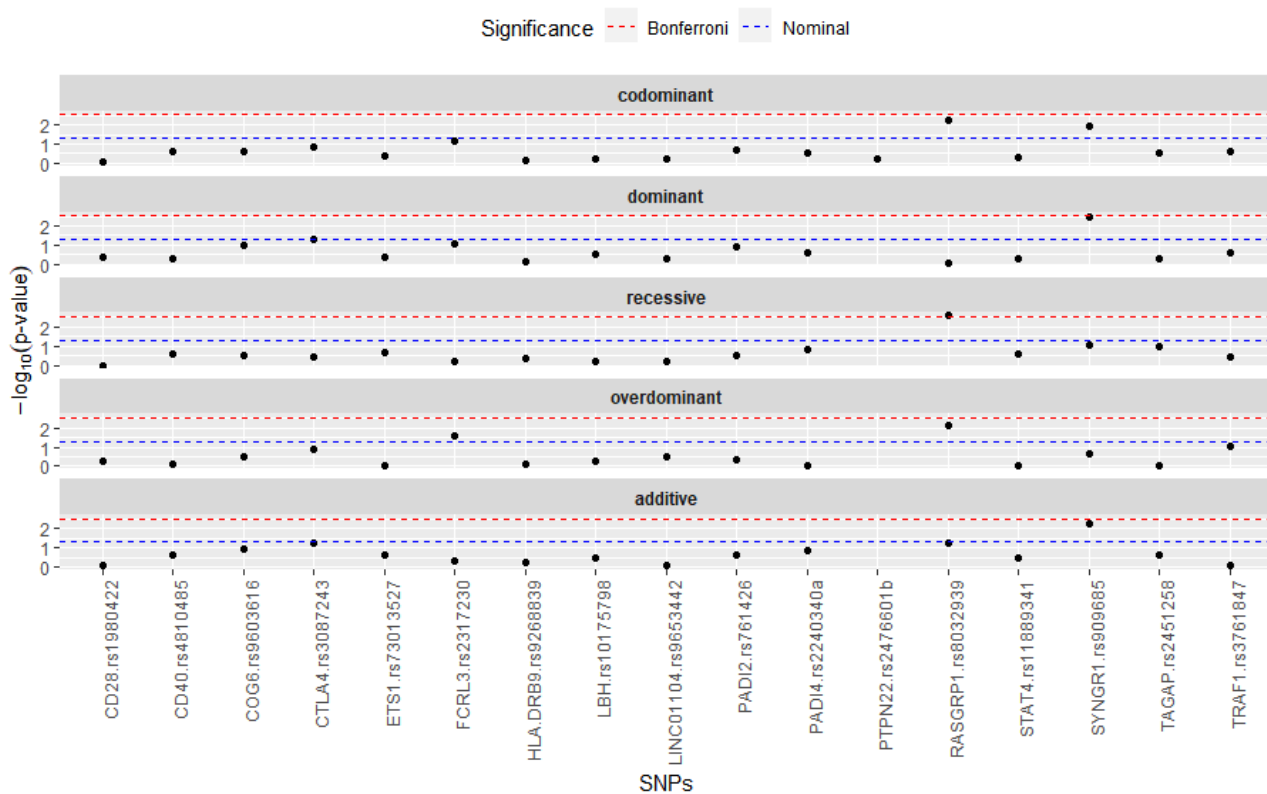


Рисунок 34 – Манхэттенский график распределения 17 SNP по РФ статусу

Далее выборка основной группы по РФ статусу была проверена по равновесию Харди-Вайнберга (таблица 27).

Таблица 27 – Анализ независимости выборки основной группы исследования по РФ статусу по нуклеотидам согласно равновесию Харди-Вайнберга

SNP	alleles	MAF	HWE
CD28-rs1980422	T/C	87,1	1
CD40-rs4810485	G/T	82,1	0,67961
<i>COG6-rs9603616</i>	<i>C/T</i>	<i>68,6</i>	<i>0,02673*</i>
CTLA4-rs3087243	G/A	69,3	0,41096
ETS1-rs73013527	C/T	65	0,44004
FCRL3-rs2317230	G/T	55,7	0,14455
HLA-DRB9-rs9268839	G/A	57,9	0,08773
LBH-rs10175798	A/G	52,1	0,81047
LINC01104-rs9653442	T/C	60	0,62577
PADI2-rs761426	T/A	67,1	0,58717
PADI4-rs2240340a	C/T	52,9	0,47990
<i>PTPN22-rs2476601</i>	<i>G/A</i>	<i>92,1</i>	<i>0,04568*</i>
RASGRP1-rs8032939	C/T	51,4	0,33762
STAT4-rs11889341	C/T	65,7	0,60392
SYNGR1-rs909685	A/T	60	0,21109
TAGAP-rs2451258	T/C	86,4	0,09949
TRAF1-rs3761847	A/G	57,9	0,80790

* – статистически значимый результат

Образцы данной выборки показали отсутствие независимости по нуклеотидам COG6 rs9603616, $p=0,02673$ и PTPN22 rs2476601, $p=0,04568$, следовательно данные нуклеотиды не участвовал в последующем анализе.

Частота генотипа А/Т нуклеотида SYNGR1 rs909685 продемонстрировала статистически значимые различия (таблица 28).

Так как при анализе были выявлены значения меньше 5-ти, был проведен точный тест Фишера, который подтвердил полученные результаты, $p=0,01032$.

Таблица 28 – Распределение генотипов SYNGR1 rs909685 среди пациенток с РФ-позитивной и РФ-негативной формами заболевания

SYNGR1 - rs909685	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
A/A	2	11,8	26	49,1	1			0,01160*	74,7
A/T	9	52,9	19	35,8	0,16	0,03	0,84		
T/T	6	35,3	8	15,1	0,1	0,02	0,61		
Dominant									
A/A	2	11,8	26	49,1	1			0,00364*	73,2
A/T-T/T	15	88,2	27	50,9	0,14	0,03	0,67		
Recessive									
A/A-A/T	11	64,7	45	84,9	1			0,08318	78,6
T/T	6	35,3	8	15,1	0,33	0,09	1,13		
Overdominant									
A/A-T/T	8	47,1	34	64,2	1			0,21406	80,1
A/T	9	52,9	19	35,8	0,5	0,16	1,5		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,35	0,16	0,77	0,00571*	74
* – статистически значимый результат									

Генотип (гетерозиготный мутант) А/Т как и Т/Т (гомозиготный мутант) продемонстрировали протективный эффект в кодоминантной модели в отношении РФ-позитивной формы РА, как и в доминантной модели А/А против А/Т-Т/Т, следовательно А/Т и Т/Т генотипы достоверно чаще встречались при РФ-негативной форме РА и снижают шансы развития РФ-позитивного РА.

Согласно проведенному анализу, частота С/Т генотипа нуклеотида RASGRP1 rs8032939 показал статистически значимые различия в кодоминантной, рецессивной и сверхдоминантной моделях наследования, (таблица 29).

Так как при анализе были выявлены значения меньше 5-ти в таблице, был проведен точный тест Фишера, который подтвердил полученные результаты, $p=0,00452$.

Таблица 29 – Распределение генотипов RASGRP1 rs8032939 среди пациенток с РФ-позитивной и РФ-негативной формами заболевания

RASGRP1 - rs8032939	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
C/C	4	23,5	12	22,6	1			0,00512*
C/T	5	29,4	35	66	2,33	1,54	10,14	
T/T	8	47,1	6	11,3	0,25	0,05	1,18	
Dominant								
C/C	4	23,5	12	22,6	1			0,93966
C/T-T/T	13	76,5	41	77,4	1,05	0,29	3,83	81,6
Recessive								
C/C-C/T	9	52,9	47	88,7	1			0,00253*
T/T	8	47,1	6	11,3	0,14	0,04	0,51	72,5
Overdominant								
C/C-T/T	12	70,6	18	34	1			0,00713*
C/T	5	29,4	35	66	4,67	1,42	15,31	74,5
log-Additive								
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,43	0,17	1,04	0,05318
								77,9

По результатам анализа частота C/T (гетерозиготный мутант) генотипа нуклеотида RASGRP1-rs8032939 достоверно чаще встречается при РФ-позитивной форме РА, соответственно увеличивая шансы развития РФ-позитивной формы РА в доминантной модели в 2,33 раза (ОШ=2,33, 95%ДИ: 1,54–10,14) и сверхдоминантной модели в 4,67 раз (ОШ=4,67, 95%ДИ: 1,42–15,31) наследования.

В то время как T/T генотип нуклеотида RASGRP1- rs8032939 достоверно чаще встречается при РФ-негативной форме РА, (ОШ=0,25, 95%ДИ: 0,05-1,18), но влияние статистически не значимо, в то время как в рецессивной модели T/T генотип данного нуклеотида уменьшает шансы РФ-позитивной формы заболевания, (ОШ=0,14, 95%ДИ: 0,04-0,51).

Частоты генотипов CD28-rs1980422, CD40-rs4810485, CTLA4-rs3087243, ETS1-rs73013527, FCRL3-rs2317230, LINC01104-rs9653442, LBN-rs10175798, PADI2-rs761426, PADI4-rs2240340a, STAT4-rs11889341, TAGAP-rs2451258, TRAF1-rs3761847, HLA-DRB9-rs9268839 не продемонстрировали статистически значимых различий между подгруппами по РФ статусу в пяти моделях наследования ($p > 0,005$), (таблица 30).

Таблица 30 – Распределение генотипов, не показавших статистически значимые различия в подгруппах с РФ–негативной и РФ-позитивной формой заболевания

Распределение генотипов								
1								
CD28-rs1980422	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC
Codominant								
T/T	14	82,4	39	73,6	1			0,80561
								82,6

Продолжение таблицы 30

1									
C/T	3	17,6	13	24,5	1,56	0,39	6,28		
C/C	0	0	1	1,9		0			
Dominant									
T/T	14	82,4	39	73,6	1			0,45199	81
C/T-C/C	3	17,6	14	26,4	1,68	0,42	6,72		
Recessive									
T/T-C/T	17	100	52	98,1	1			1	81
C/C	0	0	1	1,9		0			
Overdominant									
T/T-C/C	14	82,4	40	75,5	1			0,54831	81,2
C/T	3	17,6	13	24,5	1,52	0,38	6,12		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	1,72	0,46	6,46	0,80561	80,9
CD40-rs4810485	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
G/G	10	58,8	36	67,9	1			0,24213	80,6
G/T	6	35,3	17	32,1	0,79	0,25	2,52		
T/T	1	5,9	0	0	0	0			
Dominant									
G/G	10	58,8	36	67,9	1			0,49547	81,1
G/T-T/T	7	41,2	17	32,1	0,67	0,22	2,08		
Recessive									
G/G-G/T	16	94,1	53	100	1			0,24285	78,7
T/T	1	5,9	0	0	0	0			
Overdominant									
G/G-T/T	11	64,7	36	67,9	1			0,80656	81,5
G/T	6	35,3	17	32,1	0,87	0,27	2,73		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,58	0,2	1,62	0,24213	80,5
CTLA4-rs3087243	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
G/G	12	70,6	23	43,4	1			0,14051	79,7
A/G	4	23,5	23	43,4	3	0,84	10,69		
A/A	1	5,9	7	13,2	3,65	0,4	33,24		
Dominant									
G/G	12	70,6	23	43,4	1			0,04836	77,7
A/G-A/A	5	29,4	30	56,6	3,13	0,97	10,15		
Recessive									
G/G-A/G	16	94,1	46	86,8	1			0,37898	80,8
A/A	1	5,9	7	13,2	2,43	0,28	21,35		
Overdominant									
G/G-A/A	13	76,5	30	56,6	1			0,13323	79,4
A/G	4	23,5	23	43,4	2,49	0,72	8,66		
log-Additive									

Продолжение таблицы 30

1									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	2,37	0,91	6,19	0,05764	78
ETS1-rs73013527	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
C/C	9	52,9	22	41,5	1			0,42706	81,9
C/T	7	41,2	22	41,5	1,29	0,41	4,06		
T/T	1	5,9	9	17	3,68	0,41	33,45		
Dominant									
C/C	9	52,9	22	41,5	1			0,41017	80,9
C/T-T/T	8	47,1	31	58,5	1,59	0,53	4,75		
Recessive									
C/C-C/T	16	94,1	44	83	1			0,21797	80,1
T/T	1	5,9	9	17	3,27	0,38	27,92		
Overdominant									
C/C-T/T	10	58,8	31	58,5	1			0,98064	81,6
C/T	7	41,2	22	41,5	1,01	0,33	3,08		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	1,62	0,7	3,73	0,24200	80,2
FCRL3-rs2317230	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
G/G	9	52,9	16	30,2	1			0,07160	78,3
G/T	3	17,6	25	47,2	4,69	1,1	19,97		
T/T	5	29,4	12	22,6	1,35	0,36	5,08		
Dominant									
G/G	9	52,9	16	30,2	1			0,09323	78,8
G/T-T/T	8	47,1	37	69,8	2,6	0,85	7,96		
Recessive									
G/G-G/T	12	70,6	41	77,4	1			0,57660	81,3
T/T	5	29,4	12	22,6	0,7	0,21	2,39		
Overdominant									
G/G-T/T	14	82,4	28	52,8	1			0,02428	76,5
G/T	3	17,6	25	47,2	4,17	1,07	16,21		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	1,32	0,64	2,73	0,45177	81
HLADRB9-rs9268839	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
G/G	6	35,3	21	39,6	1			0,76870	83,1
A/G	6	35,3	21	39,6	1	0,28	3,61		
A/A	5	29,4	11	20,8	0,63	0,16	2,53		
Dominant									
G/G	6	35,3	21	39,6	1			0,74874	81,5
A/G-A/A	11	64,7	32	60,4	0,83	0,27	2,59		
Recessive									
G/G-A/G	12	70,6	42	79,2	1			0,46824	81,1

Продолжение таблицы 30

1									
A/A	5	29,4	11	20,8	0,63	0,18	2,16		
Overdominant									
G/G-A/A	11	64,7	32	60,4	1			0,74874	81,5
A/G	6	35,3	21	39,6	1,2	0,39	3,75		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,8	0,4	1,63	0,54515	81,2
LBH-rs10175798	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
A/A	6	35,3	12	22,6	1			0,59189	82,6
A/G	8	47,1	29	54,7	1,81	0,52	6,35		
G/G	3	17,6	12	22,6	2	0,4	9,91		
Dominant									
A/A	6	35,3	12	22,6	1			0,309711	80,6
A/G-G/G	11	64,7	41	77,4	1,86	0,57	6,09		
Recessive									
A/A-A/G	14	82,4	41	77,4	1			0,65721	81,4
G/G	3	17,6	12	22,6	1,37	0,34	5,56		
Overdominant									
A/A-G/G	9	52,9	24	45,3	1			0,58228	81,3
A/G	8	47,1	29	54,7	1,36	0,45	4,06		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	1,46	0,65	3,3	0,35359	80,7
LINC01104_rs9653442	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
T/T	7	41,2	17	32,1	1			0,62194	82,7
C/T	7	41,2	29	54,7	1,71	0,51	5,7		
C/C	3	17,6	7	13,2	0,96	0,19	4,82		
Dominant									
T/T	7	41,2	17	32,1	1			0,49547	81,1
C/T-C/C	10	58,8	36	67,9	1,48	0,48	4,57		
Recessive									
T/T-C/T	14	82,4	46	86,8	1			0,65543	81,4
C/C	3	17,6	7	13,2	0,71	0,16	3,12		
Overdominant									
T/T-C/C	10	58,8	24	45,3	1			0,33037	80,7
C/T	7	41,2	29	54,7	1,73	0,57	5,22		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	1,11	0,49	2,53	0,80186	81,5
PADI2-rs761426	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
T/T	10	58,8	20	37,7	1			0,21357	78,8
A/T	7	41,2	27	50,9	1,93	0,63	5,94		
A/A	0	0	6	11,3		0			

Продолжение таблицы 30

1									
Dominant									
T/T	10	58,8	20	37,7	1			0,12770	79,3
A/T-A/A	7	41,2	33	62,3	2,36	0,77	7,18		
Recessive									
T/T-A/T	17	100	47	88,7	1			0,32419	78,1
A/A	0	0	6	11,3		0			
Overdominant									
T/T-A/A	10	58,8	26	49,1	1			0,48218	81,1
A/T	7	41,2	27	50,9	1,48	0,49	4,48		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	2,49	0,93	6,68	0,21357	78
PADI4-rs2240340	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
C/C	7	41,2	14	26,4	1			0,27652	81
C/T	8	47,1	24	45,3	1,5	0,45	5,03		
T/T	2	11,8	15	28,3	3,75	0,66	21,2		
Dominant									
C/C	7	41,2	14	26,4	1			0,25666	80,3
C/T-T/T	10	58,8	39	73,6	1,95	0,62	6,11		
Recessive									
C/C-C/T	15	88,2	38	71,7	1			0,14339	79,5
T/T	2	11,8	15	28,3	2,96	0,6	14,54		
Overdominant									
C/C-T/T	9	52,9	29	54,7	1			0,89828	81,6
C/T	8	47,1	24	45,3	0,93	0,31	2,78		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	1,83	0,83	4,02	0,12220	79,2
STAT4-rs11889341	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
C/C	6	35,3	23	43,4	1			0,50190	82,2
C/T	8	47,1	26	49,1	0,85	0,26	2,81		
T/T	3	17,6	4	7,5	0,35	0,06	1,99		
Dominant									
C/C	6	35,3	23	43,4	1			0,55272	81,3
C/T-T/T	11	64,7	30	56,6	0,71	0,23	2,21		
Recessive									
C/C-C/T	14	82,4	49	92,5	1			0,25322	80,3
T/T	3	17,6	4	7,5	0,38	0,08	1,91		
Overdominant									
C/C-T/T	9	52,9	27	50,9	1			0,88594	81,6
C/T	8	47,1	26	49,1	1,08	0,36	3,24		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,65	0,28	1,51	0,31395	80,6

Продолжение таблицы 30

1									
TAGAP-rs2451258	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
T/T	12	70,6	42	79,2	1			0,28132	81,1
C/T	3	17,6	10	18,9	0,95	0,23	4,02		
C/C	2	11,8	1	1,9	0,14	0,01	1,71		
Dominant									
T/T	12	70,6	42	79,2	1			0,46824	81,1
C/T-C/C	5	29,4	11	20,8	0,63	0,18	2,16		
Recessive									
T/T-C/T	15	88,2	52	98,1	1			0,11155	79,1
C/C	2	11,8	1	1,9	0,14	0,01	1,7		
Overdominant									
T/T-C/C	14	82,4	43	81,1	1			0,90992	81,6
C/T	3	17,6	10	18,9	1,09	0,26	4,51		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,56	0,22	1,43	0,23028	80,2
TRAF1-rs3761847									
	РФ- n=17	%	РФ+ n=53	%	ОШ	95%ДИ		p	AIC
Codominant									
A/A	4	23,5	20	37,7	1			0,24538	80,8
A/G	11	64,7	22	41,5	0,4	0,11	1,46		
G/G	2	11,8	11	20,8	1,1	0,17	7		
Dominant									
A/A	4	23,5	20	37,7	1			0,27225	80,4
A/G-G/G	13	76,5	33	62,3	0,51	0,15	1,77		
Recessive									
A/A-A/G	15	88,2	42	79,2	1			0,38817	80,9
G/G	2	11,8	11	20,8	1,96	0,39	9,9		
Overdominant									
A/A-G/G	6	35,3	31	58,5	1			0,09428	78,8
A/G	11	64,7	22	41,5	0,39	0,12	1,2		
log-Additive									
0,1,2	17	24,3	53	75,7	0,9	0,42	1,94	0,79230	81,5

Анализируя связь между частотами генотипов 17 SNP и АЦЦП-положительной и АЦЦП-негативной формами РА, по результатам Манхэттонского графика в пяти моделях наследования значимые различия продемонстрировали RAD14 - rs2240340, STAT4 - rs11889341, FCRL3 - rs2317230 и TAGAP - rs2451258 (рисунок 35).

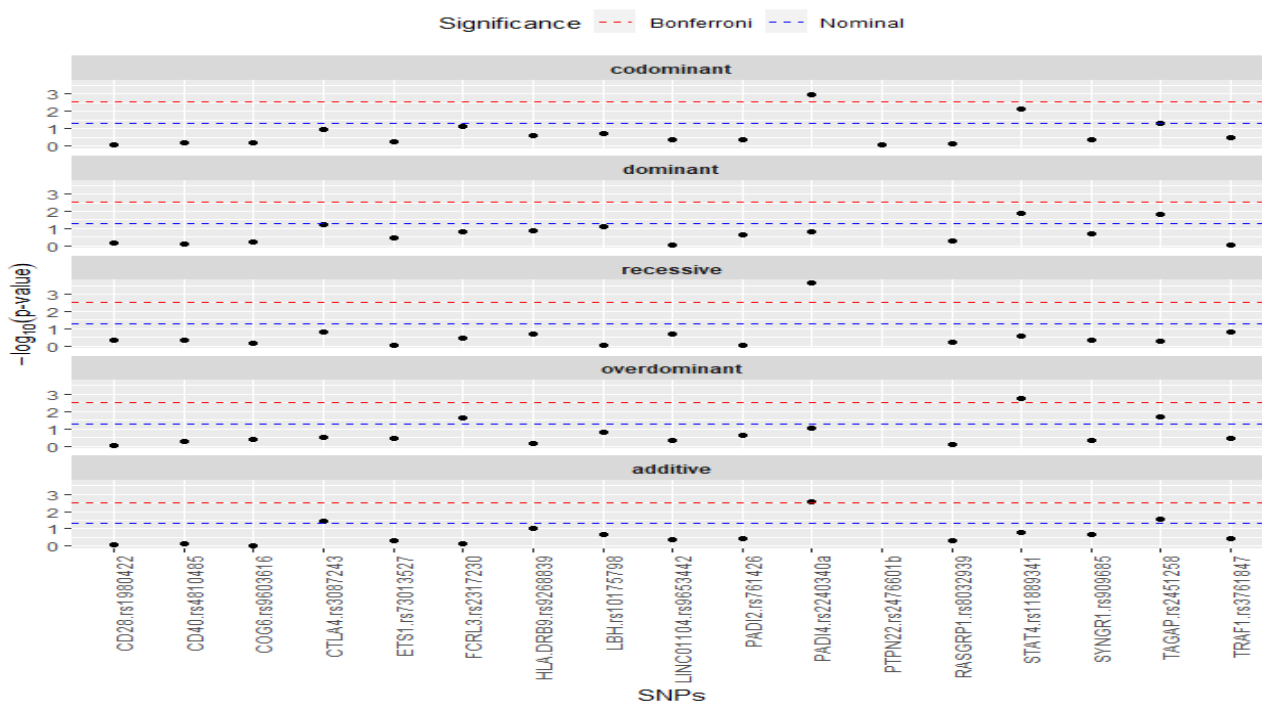


Рисунок 35 – Манхэттенский график распределения 17 SNP по АЦЦП статусу

Далее выборка основной группы по АЦЦП статусу была проверена по равновесию Харди-Вайнберга (таблица 31).

Таблица 31 – Анализ независимости выборки основной группы исследования по АЦЦП статусу по нуклеотидам согласно равновесию Харди-Вайнберга

<i>SNPs</i>	<i>Alleles</i>	<i>MAF</i>	<i>HWE</i>
CD28- rs1980422	T/C	87,1	1
CD40- rs4810485	G/T	82,1	0,67961
<i>COG6- rs9603616</i>	<i>C/T</i>	<i>69,6</i>	<i>0,03922*</i>
<i>CTLA4 -rs3087243</i>	<i>G/A</i>	<i>69,3</i>	<i>0,04964*</i>
ETS1- rs73013527	C/T	65	0,44004
FCRL3 -rs2317230	G/T	55,7	0,14455
HLA-DRB9- rs9268839	G/A	57,9	0,08773
LBH -rs10175798	A/G	52,1	0,81047
LINC01104- rs9653442	T/C	60	0,6257
PADI2 -rs761426	T/A	67,1	0,587174
PADI4- rs2240340	C/T	52,9	0,47990
<i>PTPN22- rs2476601</i>	<i>G/A</i>	<i>92,1</i>	<i>0,02653*</i>
RASGRP1- rs8032939	C/T	51,4	0,33762
STAT4- rs11889341	C/T	65,7	0,6039
SYNGR1- rs909685	A/T	60	0,21109
TAGAP- rs2451258	T/C	86,4	0,09949
TRAF1- rs3761847	A/G	57,9	0,80790
* – статистически значимый результат			

Образцы данной выборки показали отсутствие независимости по нуклеотидам COG6 - rs9603616, $p=0,03922$, CTLA4 - rs3087243, $p=0,04964$ и RTPN22 - rs2476601, $p=0,02653$, в связи с этим данные нуклеотиды не участвовали в последующем анализе.

Согласно анализу RAD14 - rs2240340 продемонстрировал ассоциацию с АЦЦП позитивной формой РА (таблица 32).

Таблица 32 – Распределение генотипов RAD14 - rs2240340 среди пациенток с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формами заболевания

<i>PADI4</i> - <i>rs2240340</i>	<i>АЦЦП</i> - <i>n=34</i>	%	<i>АЦЦП</i> + <i>n=36</i>	%	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
<i>C/C</i>	13	38,2	8	22,2	1			0,00115*	89,5
<i>C/T</i>	19	55,9	13	36,1	2,11	1,36	3,44		
<i>T/T</i>	2	5,9	15	41,7	12,19	2,19	67,94		
Dominant									
<i>C/C</i>	13	38,2	8	22,2	1			0,14273	98,8
<i>C/T-T/T</i>	21	61,8	28	77,8	2,17	0,76	6,17		
Recessive									
<i>C/C-C/T</i>	32	94,1	21	58,3	1			0,00023*	87,5
<i>T/T</i>	2	5,9	15	41,7	11,43	2,37	55,19		
Overdominant									
<i>C/C-T/T</i>	15	44,1	23	63,9	1			0,09596	98,2
<i>C/T</i>	19	55,9	13	36,1	0,45	0,17	1,16		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	2,85	1,38	5,9	0,002599*	91,9
* – статистически значимый результат									

T/T (гомозиготный мутант) генотип данного нуклеотида ассоциирован с АЦЦП-позитивной формой заболевания, $p<0,005$, в кодоминантной, доминантной моделях наследования. Так же была выявлена достоверная статистическая значимость всех генотипов RAD14-rs2240340 в логадитивной модели наследования. Так как при анализе число в одной из ячеек было менее 5-ти, проведен точный тест Фишера, $p=0,00234^*$, где была доказана достоверность значимости. Так же следует отметить, что C/T (гетерозиготный мутант) данного нуклеотида продемонстрировал ассоциацию с АЦЦП-негативной формой заболевания в кодоминантной модели наследования, $p=0,00115$, $ОШ=2,11(95\%ДИ:1,36-3,44)$.

Нуклеотид FCRL3 - rs2317230 также продемонстрировал ассоциацию с АЦЦП-позитивной формой РА, ($p>0,005$), (таблица 33).

В результате анализа, G/T (гетерозиготный мутант) генотип нуклеотида FCRL3 - rs2317230 продемонстрировал статистическую значимость при АЦЦП-позитивной форме РА в сверхдоминантной модели наследования, $p=0,02354$, $ОШ=3,1(95\%ДИ: 1,14-8,48)$.

Таблица 33 – Распределение генотипов FCRL3 - rs2317230 среди пациенток с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формами заболевания

<i>FCRL3- rs2317230</i>	<i>АЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>АЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
G/G	15	44,1	10	27,8	1			0,07679	97,9
G/T	9	26,5	19	52,8	3,17	1,03	9,77		
T/T	10	29,4	7	19,4	1,05	0,3	3,68		
Dominant									
G/G	15	44,1	10	27,8	1			0,152913	98,9
G/T-T/T	19	55,9	26	72,2	2,05	0,76	5,55		
Recessive									
G/G-G/T	24	70,6	29	80,6	1			0,33037	100
T/T	10	29,4	7	19,4	0,58	0,19	1,75		
Overdominant									
G/G-T/T	25	73,5	17	47,2	1			0,02354*	95,9
G/T	9	26,5	19	52,8	3,1	1,14	8,48		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,11	0,6	2,06	0,72788	100,9
* – статистически значимый результат									

Нуклеотид STAT4 - rs11889341 продемонстрировал достоверно большую частоту как в АЦЦП-позитивной, так и АЦЦП-негативной форме заболевания (таблица 34).

Таблица 34 – Распределение генотипов STAT4 - rs11889341 среди пациенток с АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формами заболевания

<i>STAT4- rs11889341</i>	<i>АЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>АЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
C/C	9	26,5	20	55,6	1			0,00716*	93,1
C/T	23	67,6	11	30,6	0,22	0,07	0,62		
T/T	2	5,9	5	13,9	2,12	1,18	6,93		
Dominant									
C/C	9	26,5	20	55,6	1			0,01267*	94,8
C/T-T/T	25	73,5	16	44,4	0,29	0,11	0,79		
Recessive									
C/C-C/T	32	94,1	31	86,1	1			0,25659	99,7
T/T	2	5,9	5	13,9	2,58	0,47	14,31		
Overdominant									
C/C-T/T	11	32,4	25	69,4	1			0,00168*	91,1
C/T	23	67,6	11	30,6	0,21	0,08	0,58		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	0,6	0,28	1,26	0,16957	99,1
* – статистически значимый результат									

C/T (гетерозиготный мутант) генотип нуклеотида STAT4 - rs11889341 продемонстрировал преобладание в АЦЦП-негативной форме в

кодоминантной, доминантной, сверхдоминантной моделях наследования, в то время как Т/Т (гомозиготный мутант) генотип превалировал в АЦЦП-положительной форме заболевания в кодоминантной и доминантной моделях наследования, $p < 0,005$. Точный тест Фишера, $p = 0,02053$.

Нуклеотид TAGAP - rs2451258 с большей частотой встречался в АЦЦП-отрицательной форме заболевания (таблица 35).

Таблица 35 – Распределение генотипов TAGAP - rs2451258 среди пациенток с АЦЦП-положительной и АЦЦП-отрицательной формами заболевания

TAGAP- rs2451258	АЦЦП- n=34	%	АЦЦП+ n=36	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC	
Codominant									
T/T	22	64,7	32	88,9	1			0,04684*	96,9
C/T	10	29,4	3	8,3	0,21	0,05	0,84		
C/C	2	5,9	1	2,8	0,34	0,03	4,03		
Dominant									
T/T	22	64,7	32	88,9	1			0,01437*	95
C/T-C/C	12	35,3	4	11,1	0,23	0,07	0,8		
Recessive									
T/T-C/T	32	94,1	35	97,2	1			0,51842	100,6
C/C	2	5,9	1	2,8	0,46	0,04	5,29		
Overdominant									
T/T-C/C	24	70,6	33	91,7	1			0,02076*	95,6
C/T	10	29,4	3	8,3	0,22	0,05	0,88		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	0,34	0,12	0,97	0,02766*	96,1
* – статистически значимый результат									

Так как в нескольких ячейках имелись значения менее 5-ти, проводился точный тест Фишера, $p = 0,07$, следовательно, результаты статистически значимых результатов являются недостоверными.

Далее проведен анализ частоты генотипов CD28-rs1980422, CD40-rs4810485, ETS1-rs73013527, LINC01104-rs9653442, LBH rs10175798, PADI2-rs761426, HLA-DRB9-rs9268839, RASGRP1-rs8032939, SYNGR1-rs909685, TRAF1-rs3761847 у АЦЦП-отрицательных и АЦЦП-положительных пациенток РА (таблица 36).

Таблица 36 – Распределение генотипов, не показавших статистически значимые различия в подгруппах с АЦЦП-отрицательной и АЦЦП-положительной формой заболевания

Распределение генотипов									
1									
CD28- rs1980422	АЦЦП- n=34	%	АЦЦП+ n=36	%	ОШ	95%ДИ	p	AIC	
Codominant									
T/T	25	73,5	28	77,8	1			0,88513	101,5

Продолжение таблицы 36

1									
C/T	8	23,5	8	22,2	0,89	0,29	2,73		
C/C	1	2,9	0	0	0	0			
Dominant									
T/T	25	73,5	28	77,8	1			0,67868	100,8
C/T-C/C	9	26,5	8	22,2	0,79	0,27	2,37		
Recessive									
T/T-C/T	33	97,1	36	100	1			0,48571	99,5
C/C	1	2,9	0	0	0	0			
Overdominant									
T/T-C/C	26	76,5	28	77,8	1			0,89644	101
C/T	8	23,5	8	22,2	0,93	0,3	2,83		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	0,72	0,26	1,97	0,88513	100,6
<i>CD40- rs4810485</i>	<i>AЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>AЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>OШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
G/G	23	67,6	23	63,9	1			0,70231	101,3
G/T	10	29,4	13	36,1	1,3	0,47	3,56		
T/T	1	2,9	0	0	0	0			
Dominant									
G/G	23	67,6	23	63,9	1			0,740475	100,9
G/T-T/T	11	32,4	13	36,1	1,18	0,44	3,18		
Recessive									
G/G-G/T	33	97,1	36	100	1			0,485714	99,5
T/T	1	2,9	0	0	0	0			
Overdominant									
G/G-T/T	24	70,6	23	63,9	1			0,550429	100,6
G/T	10	29,4	13	36,1	1,36	0,5	3,7		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,03	0,41	2,6	0,70231	101
<i>ETS1- rs73013527</i>	<i>AЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>AЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>OШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
C/C	13	38,2	18	50	1			0,58750	101,9
C/T	16	47,1	13	36,1	0,59	0,21	1,63		
T/T	5	14,7	5	13,9	0,72	0,17	3,02		
Dominant									
C/C	13	38,2	18	50	1			0,32125	100
C/T-T/T	21	61,8	18	50	0,62	0,24	1,6		
Recessive									
C/C-C/T	29	85,3	31	86,1	1			0,92223	101
T/T	5	14,7	5	13,9	0,94	0,25	3,57		
Overdomint									
C/C-T/T	18	52,9	23	63,9	1			0,35233	100,1
C/T	16	47,1	13	36,1	0,64	0,24	1,66		

Продолжение таблицы 36

1									
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	0,77	0,4	1,52	0,45446	100,4
<i>HLA-DRB9- rs9268839</i>	<i>АЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>АЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
G/G	10	29,4	17	47,2	1			0,24337	100,2
A/G	14	41,2	13	36,1	0,55	0,18	1,62		
A/A	10	29,4	6	16,7	0,35	0,1	1,27		
Dominant									
G/G	10	29,4	17	47,2	1			0,12438	98,6
A/G-A/A	24	70,6	19	52,8	0,47	0,17	1,25		
Recessive									
G/G-A/G	24	70,6	30	83,3	1			0,20287	99,4
A/A	10	29,4	6	16,7	0,48	0,15	1,51		
Overdominant									
G/G-A/A	20	58,8	23	63,9	1			0,66344	100,8
A/G	14	41,2	13	36,1	0,81	0,31	2,12		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	0,59	0,31	1,11	0,09434	98,2
<i>LBH- rs10175798</i>	<i>АЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>АЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
A/A	12	35,3	6	16,7	1			0,18445	99,6
A/G	15	44,1	22	61,1	2,93	0,9	9,54		
G/G	7	20,6	8	22,2	2,29	0,56	9,37		
Dominant									
A/A	12	35,3	6	16,7	1			0,07286	97,8
A/G-G/G	22	64,7	30	83,3	2,73	0,89	8,39		
Recessive									
A/A-A/G	27	79,4	28	77,8	1			0,86770	101
G/G	7	20,6	8	22,2	1,1	0,35	3,46		
Overdominant									
A/A-G/G	19	55,9	14	38,9	1			0,153644	98,9
A/G	15	44,1	22	61,1	1,99	0,77	5,16		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,55	0,77	3,12	0,21447	99,4
<i>LINC01104- rs9653442</i>	<i>АЦЦП- n=34</i>	<i>%</i>	<i>АЦЦП+ n=36</i>	<i>%</i>	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
T/T	12	35,3	12	33,3	1			0,42748	101,3
C/T	19	55,9	17	47,2	0,89	0,32	2,52		
C/C	3	8,8	7	19,4	2,33	0,48	11,23		
Dominant									
T/T	12	35,3	12	33,3	1			0,86286	101
C/T-C/C	22	64,7	24	66,7	1,09	0,41	2,93		
Recessive									

Продолжение таблицы 36

1									
T/T-C/T	31	91,2	29	80,6	1			0,19825	99,3
C/C	3	8,8	7	19,4	2,49	0,59	10,57		
Overdominant									
T/T-C/C	15	44,1	19	52,8	1			0,46842	100,5
C/T	19	55,9	17	47,2	0,71	0,28	1,81		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,33	0,65	2,7	0,42980	100,4
<i>PADI2</i> - <i>rs761426</i>	<i>AЦЦП</i> - <i>n=34</i>	%	<i>AЦЦП</i> + <i>n=36</i>	%	<i>OШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
T/T	17	50	13	36,1	1			0,46251	101,4
A/T	14	41,2	20	55,6	1,87	0,69	5,05		
A/A	3	8,8	3	8,3	1,31	0,23	7,57		
Dominant									
T/T	17	50	13	36,1	1			0,23990	99,6
A/T-A/A	17	50	23	63,9	1,77	0,68	4,6		
Recessive									
T/T-A/T	31	91,2	33	91,7	1			0,94163	101
A/A	3	8,8	3	8,3	0,94	0,18	5,01		
Overdominant									
T/T-A/A	20	58,8	16	44,4	1			0,22811	99,5
A/T	14	41,2	20	55,6	1,79	0,69	4,61		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,41	0,66	2,99	0,37247	100,2
<i>RASGRP1</i> - <i>rs8032939</i>	<i>AЦЦП</i> - <i>n=34</i>	%	<i>AЦЦП</i> + <i>n=36</i>	%	<i>OШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
C/C	9	26,5	7	19,4	1			0,74817	102,4
C/T	19	55,9	21	58,3	1,42	0,44	4,56		
T/T	6	17,6	8	22,2	1,71	0,4	7,29		
Dominant									
C/C	9	26,5	7	19,4	1			0,48389	100,5
C/T-T/T	25	73,5	29	80,6	1,49	0,49	4,59		
Recessive									
C/C-C/T	28	82,4	28	77,8	1			0,631862	100,8
T/T	6	17,6	8	22,2	1,33	0,41	4,34		
Overdominant									
C/C-T/T	15	44,1	15	41,7	1			0,83593	100,9
C/T	19	55,9	21	58,3	1,11	0,43	2,85		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,31	0,64	2,71	0,45754	100,4
<i>SYNGR1</i> - <i>rs909685</i>	<i>AЦЦП</i> - <i>n=34</i>	%	<i>AЦЦП</i> + <i>n=36</i>	%	<i>OШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
A/A	11	32,4	17	47,2	1			0,43425	101,3
A/T	15	44,1	13	36,1	0,56	0,19	1,62		

Продолжение таблицы 36

1									
T/T	8	23,5	6	16,7	0,49	0,13	1,78		
Dominant									
A/A	11	32,4	17	47,2	1			0,20307	99,4
A/T-T/T	23	67,6	19	52,8	0,53	0,2	1,41		
Recessive									
A/A-A/T	26	76,5	30	83,3	1			0,47276	100,5
T/T	8	23,5	6	16,7	0,65	0,2	2,12		
Overdominant									
A/A-T/T	19	55,9	23	63,9	1			0,49420	100,5
A/T	15	44,1	13	36,1	0,72	0,27	1,87		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	0,68	0,36	1,28	0,22331	99,5
<i>TRAF1</i> - <i>rs3761847</i>	<i>АЦЦП</i> - <i>n=34</i>	%	<i>АЦЦП</i> + <i>n=36</i>	%	<i>ОШ</i>	<i>95%ДИ</i>		<i>p</i>	<i>AIC</i>
Codominant									
A/A	12	35,3	12	33,3	1			0,33462	100,8
A/G	18	52,9	15	41,7	0,83	0,29	2,39		
G/G	4	11,8	9	25	2,25	0,54	9,34		
Dominant									
A/A	12	35,3	12	33,3	1			0,86286	101
A/G-G/G	22	64,7	24	66,7	1,09	0,41	2,93		
Recessive									
A/A-A/G	30	88,2	27	75	1			0,14979	98,9
G/G	4	11,8	9	25	2,5	0,69	9,06		
Overdominant									
A/A-G/G	16	47,1	21	58,3	1			0,34447	100,1
A/G	18	52,9	15	41,7	0,63	0,25	1,63		
log-Additive									
0,1,2	34	48,6	36	51,4	1,36	0,69	2,64	0,36965	100,2

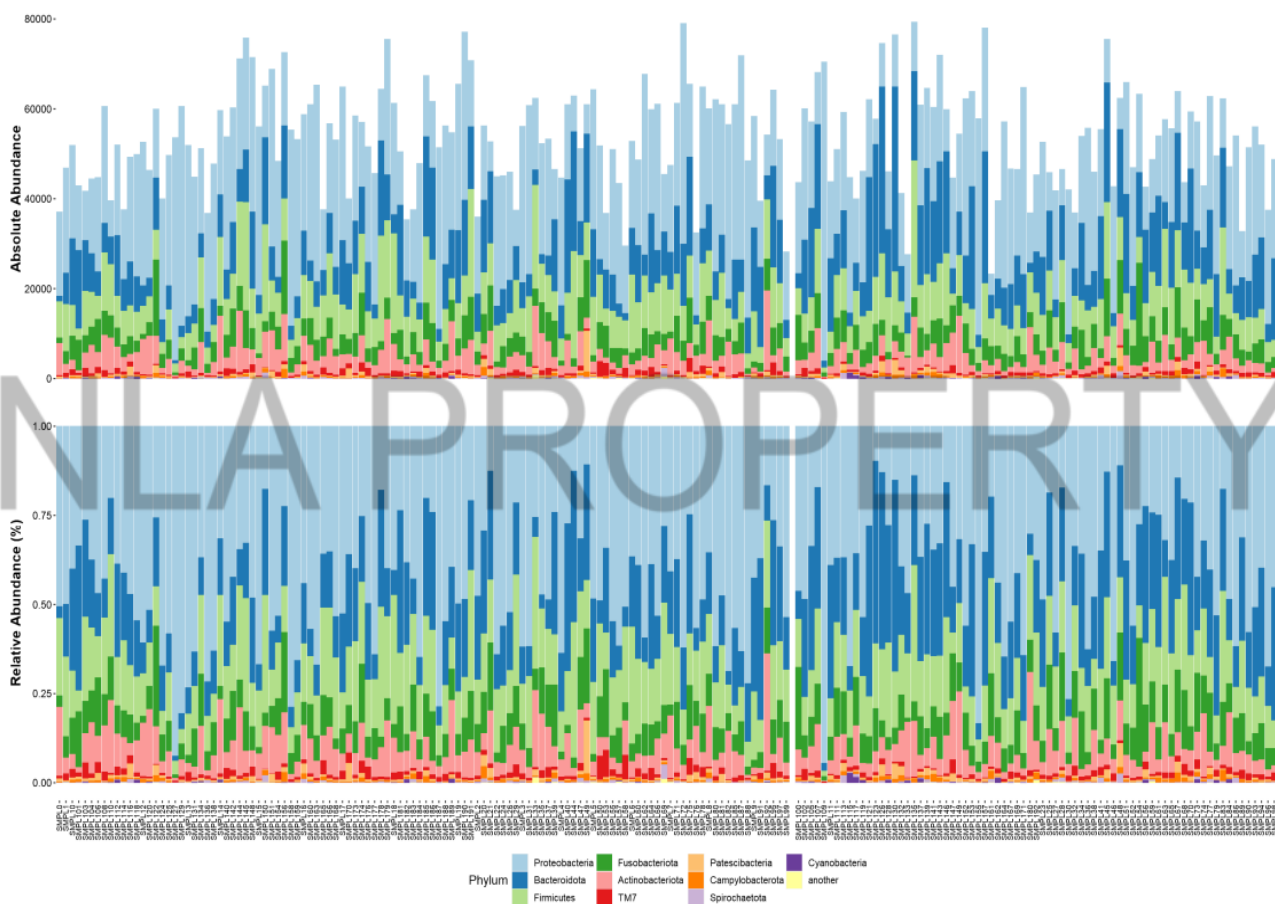
По результатам анализа данные SNP не продемонстрировали статистически значимых различий между АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной подгруппами ($p > 0,005$). Данные, представленные в этой главе опубликованы [24, p. 751-755; 306].

Таким образом в нашей выборке у пациентов РА достоверно преобладал G/G генотип нуклеотида HLA-DRB9 - rs9268839, при статификации основной группы по РФ статусу С/Т генотип нуклеотида RASGRP1-rs8032939 продемонстрировал преобладание при РФ-позитивной форме, в то время как Т/Т генотип данного нуклеотида и А/Т и Т/Т генотипы SYNGR1- rs909685 достоверно преобладали при РФ-негативной форме заболевания. При анализе генов в зависимости от АЦЦП статуса G/Т генотип FCRL3 - rs2317230 нуклеотида, Т/Т генотип нуклеотида STAT4 - rs11889341 и Т/Т генотип нуклеотида PADI4-rs2240340 продемонстрировали преобладание при АЦЦП-

позитивной форме заболевания, в то время как С/Т генотипы нуклеотида STAT4 и PADI4 ассоциированы с АЦЦП-негативной формой заболевания.

3.4 Изучение микробиоценоза ротовой полости при ревматоидном артрите

Проведен биоинформатический анализ обилия микробиоценоза ротовой полости на уровне филума во всех образцах обеих групп исследования. Типы Proteobacteria, Firmicutes и Bacteroidota преобладали в обеих группах исследования (рисунок 36).



а – Control - контрольная группа; б – Case - пациенты с РА

Рисунок 36 – Анализ обилия микробиоценоза ротовой полости на уровне типов в 2-х группах исследования

Далее проведен анализ α -разнообразия микробиоценоза ротовой полости на уровне OTU (рисунок 37).

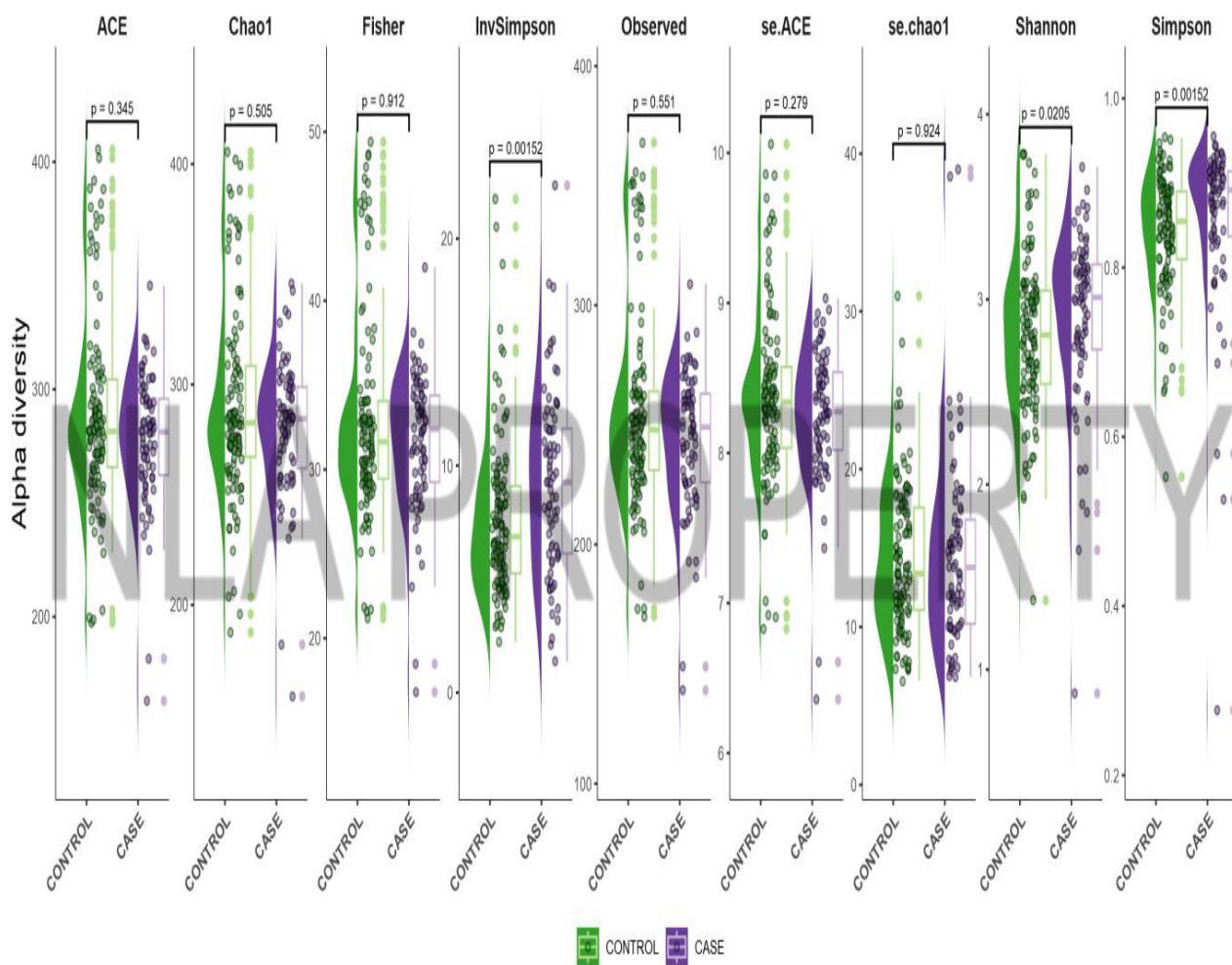


Рисунок 37 – α -разнообразие микробиоценоза ротовой полости по основным индексам

Примечание – Case - пациенты с РА; Control - контрольная группа

В результате были выявлены статистически значимые различия α -разнообразия микробиома ротовой полости по индексу Simpson, $p \leq 0,00152$, и по индексу Shannon, $p \leq 0,0205$.

Далее проведен анализ β -разнообразия микробиоценоза ротовой полости на уровне OTU (рисунок 38).

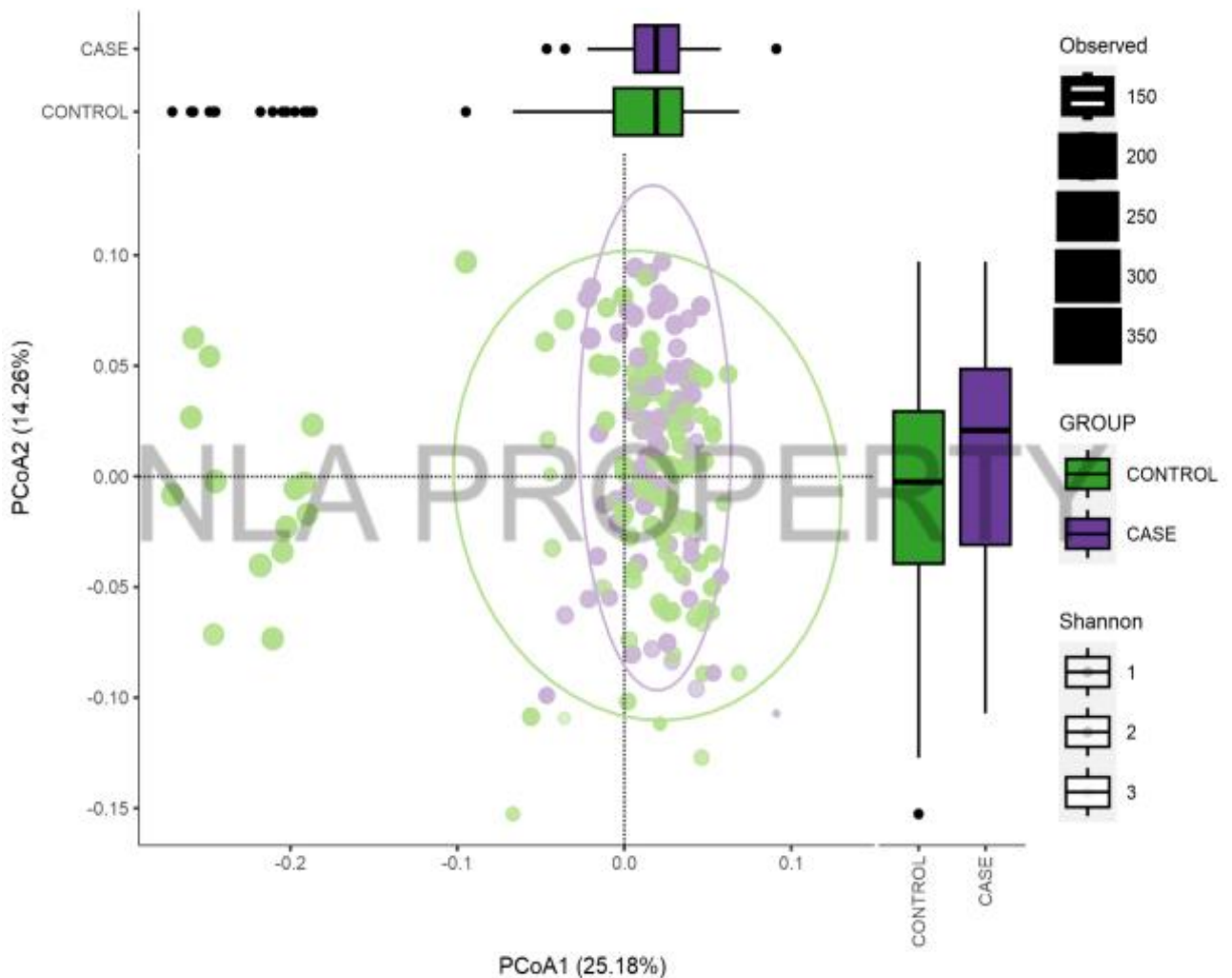


Рисунок 38 – β -разнообразие микробиоценоза ротовой полости на уровне OTU

Примечание – Case - пациенты с РА; Control - контрольная группа

В результате сравнения разнообразия между сообществами в микробиоценозе ротовой полости различий не выявлены R-squared: 0,01619; p-value: 0,196.

Для дальнейшей оценки различий в микробиоценозе ротовой полости между пациентками с РА и здоровыми субъектами был использован метод линейного дискриминантного анализа (LDA), позволивший выявить различия в составе микробиома исследуемых групп и идентифицировать значимые биомаркеры (рисунок 39).

Linear discriminant analysis effect size - LEfSe
LDA score ≥ 2

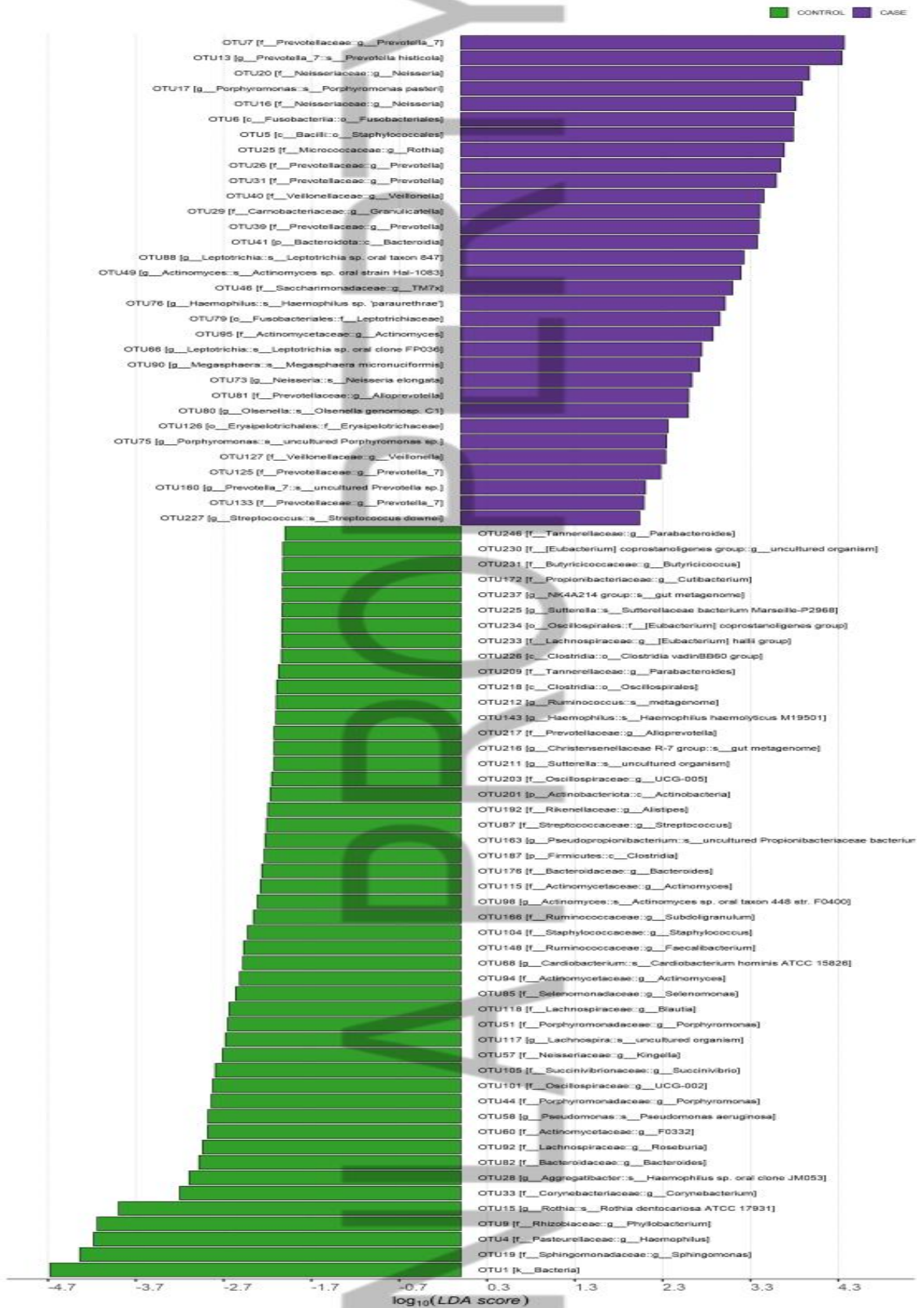


Рисунок 39 – Линейный дискриминантный анализ (LDA) микробиоценоза ротовой полости, размер эффекта (Lefse)

Примечание – Case - пациенты с ПА; Control - контрольная группа

Линейный дискриминантный анализ (Lefse) микробиоценоза ротовой полости выявил значительные различия в таксонах. Так в микробиоме ротовой полости пациенток с РА на уровне семейств преобладали таксоны: Prevotellaceae ($p \leq 0,0001$), Neisseriaceae ($p \leq 0,00001$); на уровне родов: Porphyromonas ($p \leq 0,001$).

Далее нами был проведен линейный дискриминантный анализ значимых таксонов микробиоценоза ротовой полости в РФ-позитивной и РФ-негативной формах заболевания (таблица 37).

Таблица 37 – Значимые таксоны в микробиоме ротовой полости в зависимости от РФ статуса

OTU	Таксоны	Форма РА	ef_lda	p
OTU136	<i>f__Actinomycetaceae::g__Actinomyces</i>	РФ-	2,480137	0,03286
OTU164	<i>g__Actinobacillus::s__uncultured Haemophilus sp.</i>	РФ-	2,085886	0,03372
OTU12	<i>g__Actinobacillus::s__Haemophilus parahaemolyticus</i>	РФ+	4,121396	0,04580
OTU80	<i>g__Olsenella::s__Olsenella genomsp. C1</i>	РФ+	2,756075	0,01723
OTU100	<i>f__Weeksellaceae::g__Bergeyella</i>	РФ+	2,547033	0,03088

В результате анализа были выявлены статистически значимые таксоны как в РФ-позитивной, так и РФ-негативной форме заболевания. Следует отметить, что разные виды одного рода *Actinobacillus* ассоциированы как с РФ-негативной, так и с РФ-позитивной формой заболевания.

В дальнейшем был проведен анализ значимых таксонов микробиома ротовой полости с помощью линейного дискриминантного анализа (таблица 38).

Таблица 38 – Значимые таксоны в микробиоме ротовой полости в зависимости от АЦЦП статуса

OTU	Таксоны	Форма РА	ef_lda	p
OTU15	<i>g__Rothia::s__Rothia dentocariosa ATCC 17931</i>	АСРА-	3,939137	0,01740
OTU74	<i>c__Cyanobacteria::o__Chloroplast</i>	АСРА-	2,940319	0,03382
OTU73	<i>g__Neisseria::s__Neisseria elongata</i>	АСРА-	2,737207	0,00591
OTU113	<i>f__Bacillaceae::g__Bacillus</i>	АСРА-	2,638630	0,03313
OTU164	<i>g__Actinobacillus::s__uncultured Haemophilus sp.</i>	АСРА-	2,015432	0,03437
OTU24	<i>f__Weeksellaceae::g__Bergeyella</i>	АСРА+	4,021623	0,01438

В результате были выявлены значимые таксоны как в АЦЦП-негативной, так и в АЦЦП-позитивной форме РА. Следует отметить, что *f__Weeksellaceae::g__Bergeyella*, которая ранее при анализе в зависимости от РФ статуса, была ассоциирована с РФ-положительной РА формой, так же ассоциирована с АЦЦП-положительной РА, $p=0,01438$. А

g_Actinobacillus::s_uncultured Haemophilus sp. Является общим статистически значимым таксоном для РФ-отрицательной и АЦЦП-отрицательной формы РА (таблица 38).

Дальнейший линейный дискриминантный анализ значимых таксонов в зависимости от степени активности заболевания, выявил статистически значимые различия (таблица 39).

g_Treponema::s_uncultured Treponema sp. и *c_Gracilibacteria::o_Absconditabacteriales (SR1)* были ассоциированы с ремиссией РА, *f_Porphyromonadaceae::g_Porphyromonas* ассоциирована с низкой активностью заболевания, в то время как *f_Staphylococcaceae::g_Staphylococcus* ассоциирована с высокой степенью заболевания (таблица 39).

Таблица 39 – Значимые таксоны в микробиоме ротовой полости в зависимости от степени активности заболевания по DAS28

OTU	Таксоны	Активность РА, DAS28	ef_lda	p
OTU140	<i>f_Porphyromonadaceae::g_Porphyromonas</i>	1 [2,6-3,2]	2,422832	0,03213
OTU104	<i>f_Staphylococcaceae::g_Staphylococcus</i>	3 [>5,1]	2,258769	0,04127
OTU139	<i>g_Treponema::s_uncultured Treponema sp.</i>	0 [<2,6]	2,543398	0,01527
OTU161	<i>c_Gracilibacteria::o_Absconditabacteriales (SR1)</i>	0 [<2,6]	2,204760	0,03510

Далее проведен анализ значимых таксонов в зависимости от рентгенологической стадии РА (таблица 40).

Таблица 40 – Значимые таксоны в микробиоме ротовой полости в зависимости от рентгенологической стадии РА

OTU	Таксоны	Р-стадия	ef_lda	p
OTU16	<i>f_Neisseriaceae::g_Neisseria</i>	1	4,120036	0,01185
OTU15	<i>g_Rothia::s_Rothia dentocariosa ATCC 17931</i>	1	3,925139	0,02039
OTU97	<i>o_Bacteroidales::f_Prevotellaceae</i>	2	2,560440	0,03628
OTU112	<i>f_Selenomonadaceae::g_Selenomonas</i>	2	2,238191	0,02000
OTU127	<i>f_Veillonellaceae::g_Veillonella</i>	3	2,398102	0,04402
OTU186	<i>f_Lactobacillaceae::g_Lactobacillus</i>	3	2,132574	0,02628
OTU104	<i>f_Staphylococcaceae::g_Staphylococcus</i>	4	2,702627	0,04518

Следует отметить, что ассоциированный с высокой степенью активности РА таксон-*f_Staphylococcaceae::g_Staphylococcus* так же ассоциирован с 4-й рентгенологической стадией РА.

Дальнейший анализ значимых таксонов в зависимости от функционального класса РА, представлен в таблице 41.

Таблица 41 – Значимые таксоны в микробиоме ротовой полости в зависимости от ФК

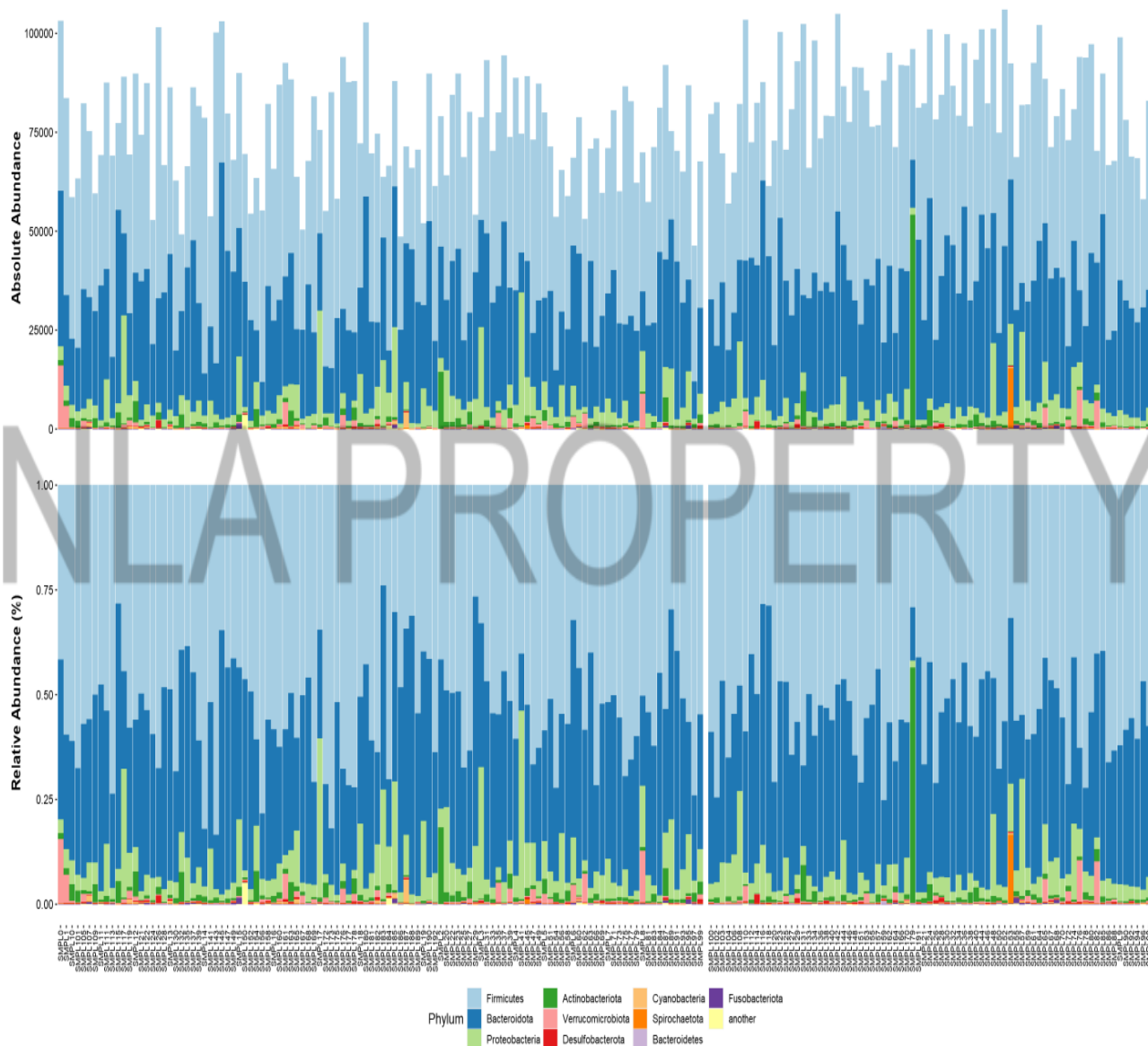
OTU	Таксоны	ФК	ef_lda	p
OTU139	<i>g__Treponema::s__uncultured Treponema sp.</i>	1	2,214197	0,04048
OTU174	<i>f__Lentimicrobiaceae::g__Lentimicrobium</i> –	1	2,138300	0,00272
OTU88	<i>g__Leptotrichia::s__Leptotrichia sp. OШal taxon 847</i>	2	3,192787	0,01374
OTU97	<i>o__Bacteroidales::f__Prevotellaceae</i>	2	2,544251	0,01234
OTU34	<i>f__Prevotellaceae::g__Prevotella</i>	3	3,391664	0,02060
OTU50	<i>f__Staphylococcaceae::g__Staphylococcus</i>	3	3,078521	0,01500

По результатам линейного дискриминатного анализа следует выделить, что разные OTU одного семейства *f__Prevotellaceae* были ассоциированы с 2-3 ФК.

Таким образом α -разнообразие микробиома ротовой полости различалось между группами исследования, разнообразие в основной группе исследования было достоверно меньше чем в контрольной группе исследования, таксономический состав микробиома ротовой полости основной и контрольной группы имел значимые различия, так в микробиоме ротовой полости пациенток с РА на уровне семейств преобладали таксоны: *Prevotellaceae* ($p \leq 0,0001$), *Neisseriaceae* ($p \leq 0,00001$); на уровне родов: *Porphyromonas* ($p \leq 0,001$). Выявлена ассоциации: рода *Actinobacillus* с РФ+ и РФ- формами заболевания; таксона *f__Weeksellaceae::g__Bergeyella* с РФ + и АЦЦП+ формами заболевания; таксона *g__Actinobacillus::s__uncultured Haemophilus sp.* с РФ- и АЦЦП- формами заболевания. Так же были выделены значимые таксоны с рентгенологической стадией, ФК и активностью РА.

3.5 Изучение микробиоценоза кишечника при ревматоидном артрите

Проведен биоинформатический анализ обилия микробиоценоза кишечника на уровне филума во всех образцах обеих групп исследования. Типы Firmicutes, Bacteroidota и Proteobacteria преобладали в обеих группах исследования (рисунок 40).



а – Control - контрольная группа; б – Case - пациенты с РА

Рисунок 40 – Анализ обилия микробиоценоза кишечника на уровне типов в 2-х группах исследования

Дальнейший анализ α -разнообразия микробиоценоза кишечника по основным индексам представлен на рисунке 41.

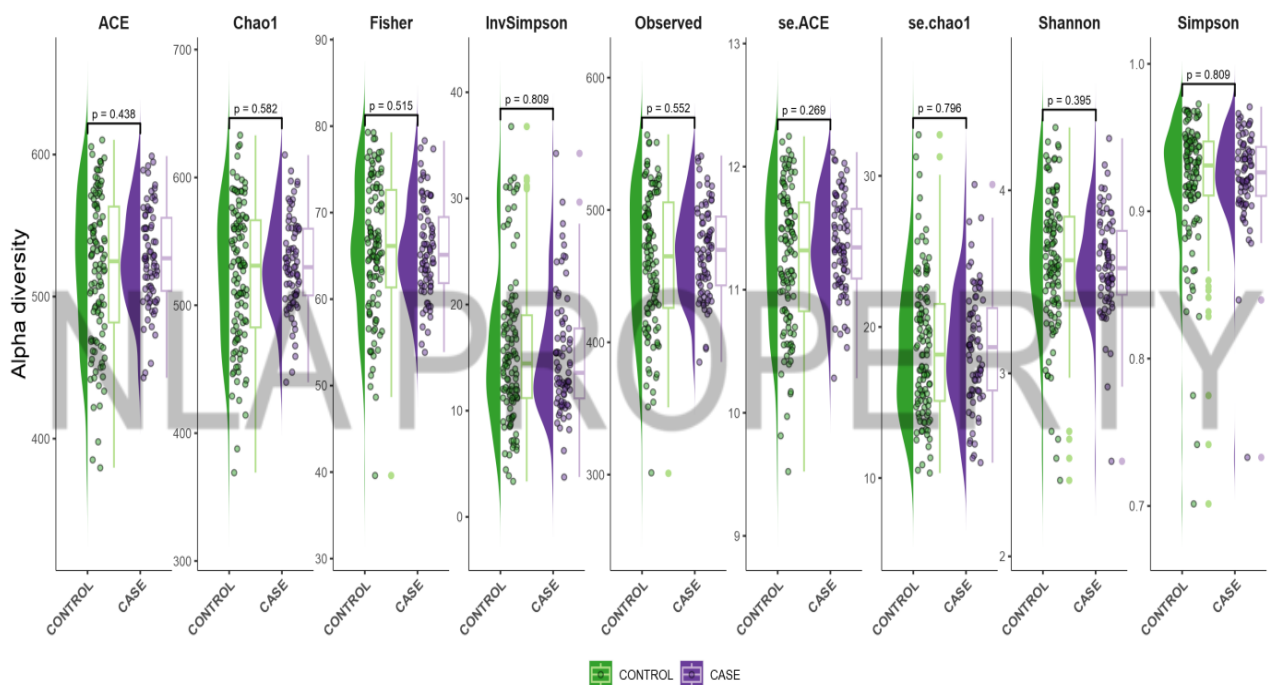


Рисунок 41 – α -разнообразие микробиоценоза кишечника по основным индексам

Примечание – Case - пациенты с РА; Control - контрольная группа

При анализе α -разнообразия микробиома кишечника на уровне OTU не было выявлено статистически значимых различий по основным индексам ($p > 0,05$).

Далее был осуществлен анализ β -разнообразия микробиоценоза кишечника на уровне OTU по основным индексам (рисунок 42).

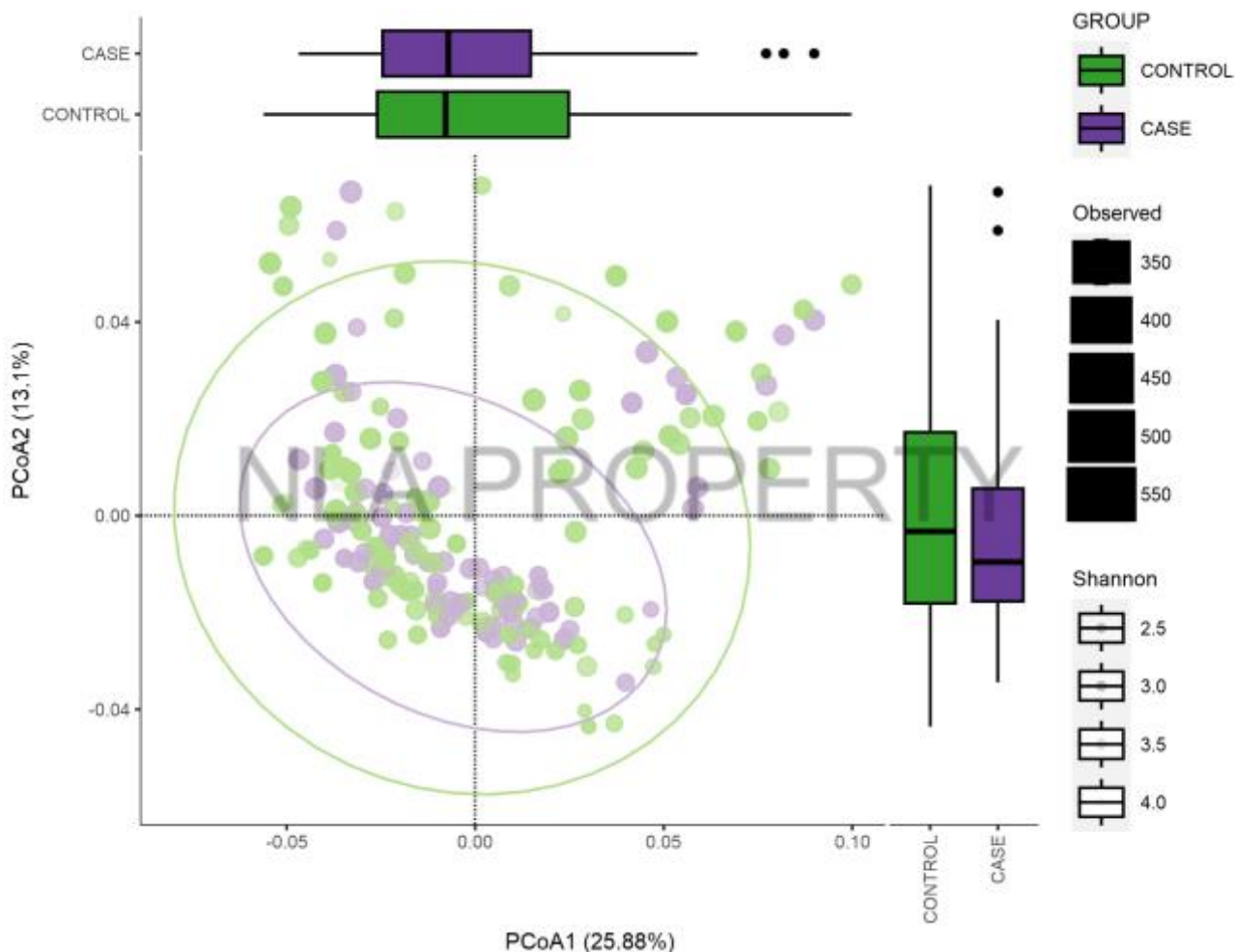


Рисунок 42 – β -разнообразие микробиоценоза кишечника на уровне OTU

Примечание – Case - пациенты с РА; Control - контрольная группа

Анализ β -разнообразия микробиоценоза кишечника на уровне OTU так же не выявил статистически значимых отличий между основной и контрольной группой R-squared: -0,01926; p-value: 0,885.

В дальнейшем нами был проведен линейный дискриминантный анализ (Lefse) микробиоценоза кишечника, который выявил значительные различия на разных таксономических уровнях между сравниваемыми сообществами (рисунок 43).

Linear discriminant analysis effect size - LefSe

LDA score ≥ 2

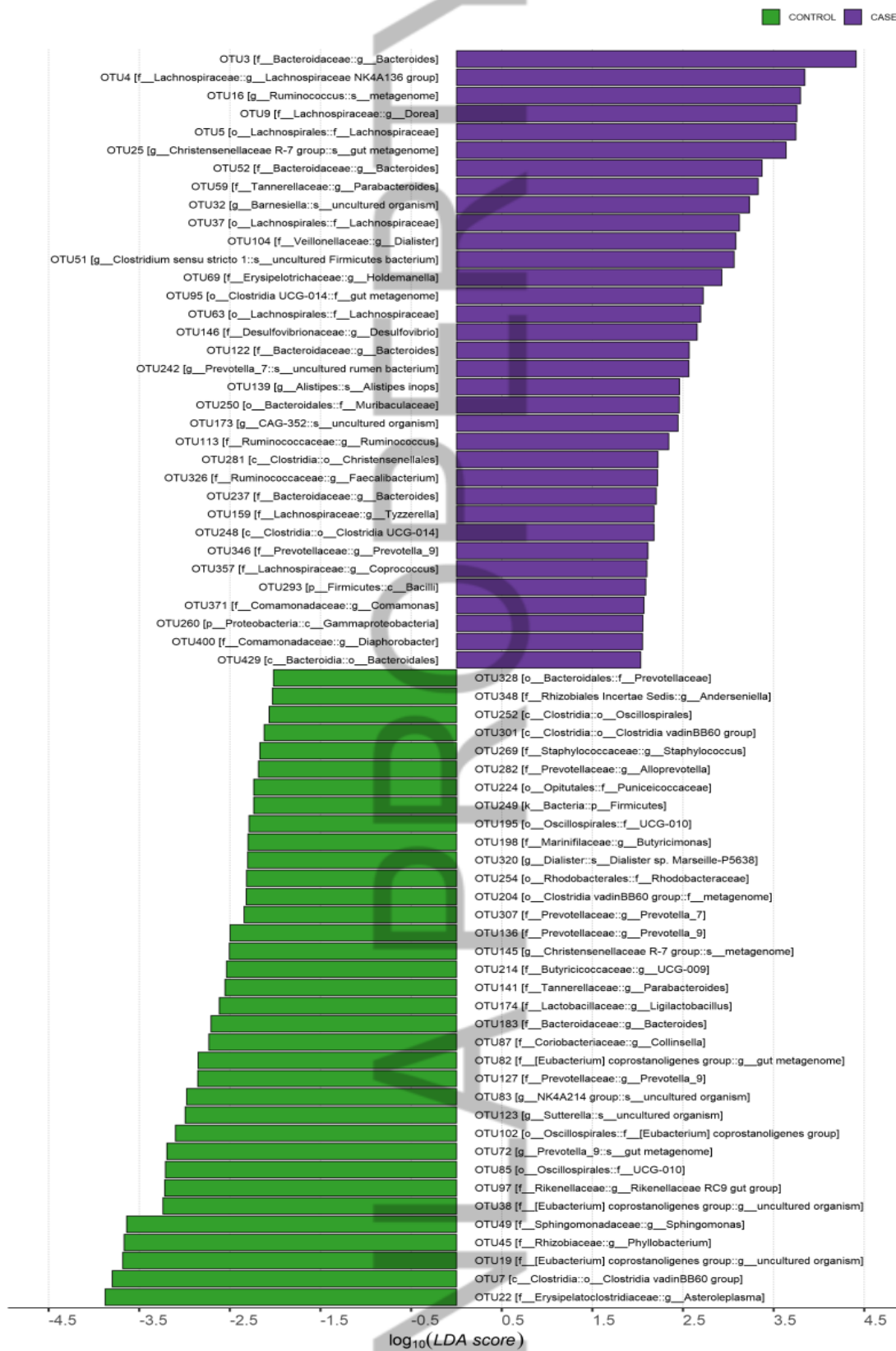


Рисунок 43 – Линейный дискриминантный анализ (LDA) микробиома кишечника, размер эффекта (Lefse)

Примечание – Case - пациенты с ПА; Control - контрольная группа

Так в микробиоме кишечника в группе РА преобладали таксоны на уровне семейств: Bacteroidaceae ($p \leq 0,003$), Lachnospiraceae (g. Dorea) ($p \leq 0,00001$), Ruminococcaceae ($p \leq 0,00002$). Были снижены бактерии семейства Coriobacteriaceae ($p \leq 0,01$).

Линейный дискриминантный анализ значимых таксонов в РФ-позитивной и РФ-негативной формах заболевания, выявил статистически значимые различия (таблица 42).

Таблица 42 – Значимые таксоны в микробиоме кишечника в зависимости от РФ статуса

OTU	Таксоны	enrich_group	ef_lda	p
OTU41	<i>g__Prevotella::s__некультурный организм</i>	РФ-	3,549694	0,03681
OTU66	<i>f__Prevotellaceae::g__Alloprevotella</i>	РФ+	3,628053	0,02967
OTU28	<i>g__Bacteroides::s__Bacteroides plebeius</i>	РФ+	3,464074	0,03794
OTU104	<i>f__Veillonellaceae::g__Dialister</i>	РФ+	3,341130	0,02577
OTU96	<i>f__Monoglobaceae::g__Monoglobus</i>	РФ+	2,654328	0,02384
OTU163	<i>f__Ruminococcaceae::g__Ruminococcus</i>	РФ+	2,435717	0,03361
OTU214	<i>f__Butyricoccaceae::g__UCG-009</i>	РФ+	2,140689	0,00734

Представители облигатной флоры были ассоциированы с обеими формами заболевания.

Линейный дискриминантный анализ значимых таксонов в АЦЦП-позитивной и АЦЦП-негативной формах заболевания, выявил статистически значимые различия (таблица 43).

Таблица 43 – Значимые таксоны в микробиоме кишечника в зависимости от АЦЦП статуса

OTU	Таксоны	Форма РА	ef_lda	p
OTU21	<i>f__Bifidobacteriaceae::g__Bifidobacterium</i>	АСРА-	4,052647	0,03010
OTU206	<i>f__Veillonellaceae::g__Veillonella</i>	АСРА-	2,945681	0,01910
OTU111	<i>o__Oscillospirales::f__[Eubacterium] coprostanoligenes group</i>	АСРА-	2,796186	0,01738
OTU132	<i>o__Lachnospirales::f__Lachnospiraceae</i>	АСРА-	2,308215	0,02933
OTU189	<i>o__Coriobacteriales::f__Coriobacteriales Incertae Sedis</i>	АСРА-	2,072560	0,03878
OTU66	<i>f__Prevotellaceae::g__Alloprevotella</i>	АСРА+	3,567094	0,01967
OTU52	<i>f__Bacteroidaceae::g__Bacteroides</i>	АСРА+	3,392102	0,03877
OTU358	<i>f__Weeksellaceae::g__Bergeyella</i>	АСРА+	2,176248	0,03611
OTU221	<i>f__Clostridiaceae::g__Clostridium sensu stricto 1</i>	АСРА+	2,085502	0,02456

Обращает на себя внимание, что *f__Prevotellaceae::g__Alloprevotella* ассоциирована с РФ-позитивной и АЦЦП-позитивной формой заболевания. *f__Weeksellaceae::g__Bergeyella*, которая ранее была ассоциирована с РФ-позитивной и АЦЦП-позитивной формой РА в микробиоме ротовой полости,

также ассоциирована с АЦЦП-позитивной формой РА в микробиоме кишечника.

Линейный дискриминантный анализ значимых таксонов в зависимости от степени активности заболевания, выявил статистически значимые различия (таблица 44).

Таблица 44 – Значимые таксоны в микробиоме кишечника в зависимости от степени активности заболевания по DAS28

OTU	Таксоны	Активность РА DAS28	ef_lda	p
OTU46	<i>c__Clostridia::o__Lachnospirales</i>	1 [2,6-3,2]	3,708606	0,01724
OTU89	<i>g__[Eubacterium] siraeum group::s__gut metagenome</i>	1 [2,6-3,2]	2,962265	0,03703
OTU199	<i>f__Ruminococcaceae::g__Faecalibacterium</i>	1 [2,6-3,2]	2,575665	0,00070
OTU256	<i>o__Oscillospirales::f__UCG-010</i>	1 [2,6-3,2]	2,284577	0,04835
OTU352	<i>f__Butyricicoccaceae::g__UCG-009</i>	1 [2,6-3,2]	2,154425	0,00745
OTU332	<i>g__Monoglobus::s__некультурная бактерия Clostridiales</i>	1 [2,6-3,2]	2,122301	0,04024
OTU373	<i>f__Lachnospiraceae::g__Lachnospiraceae NK3A20 group</i>	1 [2,6-3,2]	2,034283	0,02088
OTU61	<i>f__Sutterellaceae::g__Sutterella</i>	2 [3,3-5,1]	3,462557	0,01422
OTU246	<i>o__Erysipelotrichales::f__Erysipelotrichaceae</i>	3 [>5,1]	2,682712	0,01253
OTU274	<i>c__Alphaproteobacteria::o__Rhodospirillales</i>	3 [>5,1]	2,329376	0,03016
OTU3	<i>f__Bacteroidaceae::g__Bacteroides</i>	0 [<2,6]	4,627515	0,04403
OTU24	<i>f__Tannerellaceae::g__Parabacteroides</i>	0 [<2,6]	3,756079	0,00851
OTU468	<i>o__Rickettsiales::f__AB1</i>	0 [<2,6]	2,312773	0,01857
OTU414	<i>c__Clostridia::o__Oscillospirales</i>	0 [<2,6]	2,107425	0,03394

Следует отметить, что *f__Lachnospiraceae* и *o__Oscillospirales* ассоциированные с АЦЦП-негативной формой заболевания, также были ассоциированы с низкой степенью активности РА.

Линейный дискриминантный анализ значимых таксонов в зависимости рентгенологической стадии заболевания, выявил статистически значимые различия, представленные в таблице 45.

Таблица 45 – Значимые таксоны в микробиоме кишечника в зависимости от рентгенологической стадии РА

OTU	Таксоны	Р-стадия РА	ef_lda	p
OTU183	<i>f__Bacteroidaceae::g__Bacteroides</i>	1	2,182293	0,01232
OTU225	<i>c__Clostridia::o__Lachnospirales</i>	1	2,124650	0,03509
OTU62	<i>f__Bifidobacteriaceae::g__Bifidobacterium</i>	2	3,206048	0,01032
OTU115	<i>g__Veillonella::s__некультурный организм</i>	2	2,908277	0,04261
OTU295	<i>g__Bacteroides::s__Bacteroides sp. Марсель-Р3166</i>	3	2,330237	0,03899
OTU274	<i>c__Alphaproteobacteria::o__Rhodospirillales</i>	3	2,261295	0,03734
OTU257	<i>f__Prevotellaceae::g__Alloprevotella</i>	4	2,612700	0,00820

Обращает на себя внимание, что *f__Prevotellaceae::g__Alloprevotella*, ассоциированная с РФ-позитивной и АЦЦП-позитивной формой заболевания, также ассоциирована с 4-й рентгенологической стадией заболевания, $p=0.00820$.

А *o__Lachnospirales* ассоциированная с АЦЦП-негативной формой заболевания, также ассоциирована с 1-й рентгенологической стадией заболевания, $p=0,03509$.

Линейный дискриминантный анализ значимых таксонов в зависимости функционального класса заболевания, выявил статистически значимые различия, представленные в таблице 46.

Таблица 46 – Значимые таксоны в микробиоме кишечника в зависимости от ФК

OTU	Таксоны	ФК РА	ef_lda	p
OTU 31	<i>g__Parasutterella::s__некультурный организм</i>	1	3,707280	0,01531
OTU46	<i>c__Clostridia::o__Lachnospirales</i>	1	3,277391	0,02025
OTU276	<i>f__Ruminococcaceae::g__Oscillospira</i>	1	2,168766	0,00801
OTU81	<i>p__Firmicutes::c__Bacilli</i>	2	3,017686	0,01963
OTU167	<i>o__Oscillospirales::f__UCG-010</i>	2	2,698619	0,01589
OTU166	<i>k__Bacteria::p__Fusobacteriota</i>	2	2,430567	0,01654
OTU429	<i>c__Bacteroidia::o__Bacteroidales</i>	2	2,211160	0,00128

o__Lachnospirales ассоциированная с АЦЦП-негативной формой заболевания и с 1-й рентгенологической стадией заболевания, так же ассоциирована с ФК1.

Далее для более последующего анализа MaAsLin2, нами был проведен анализ метаболических путей в микробиоме кишечника в зависимости от формы заболевания. Таким образом у пациенток с РФ-позитивной АЦЦП-позитивной формой РА были выявлены 13 значимых путей, таблица 47.

Таблица 47 – Значимые метаболические пути в микробиоме кишечника у пациентов с РФ+АЦЦП+ формой РА

Метаболические пути	Форма РА	Коэффициент	St_derr.	p	q
1	2	3	4	5	6
isopropanol.biosynthesis	РФ+АЦЦП+	1,14298	0,42945	0,00847	0,99978
catechol.degradation.II.meta.cleavage.pathway.	РФ+АЦЦП+	1,16688	0,45284	0,01076	0,99978
catechol.degradation.to.2.oxopent.4enoate.II	РФ+АЦЦП+	1,18240	0,46261	0,01141	0,99978
S.methyl.5.thio..alpha..D.ribose.1.phosphate.degradation	РФ+АЦЦП+	-1,21485	0,48535	0,01319	0,99978
keratan sulfate degradation	РФ+АЦЦП+	-1,20664	0,48222	0,01322	0,99978
nylon.6.oligomer.degradation	РФ+АЦЦП+	0,89871	0,37310	0,01700	0,99978
chlorosalicylate.degradation	РФ+АЦЦП+	0,89856	0,37367	0,01718	0,99978
allantoin.degradation.IV..anaerobic	РФ+АЦЦП+	-1,06705	0,45633	0,02045	0,99978

Продолжение таблицы 47

1	2	3	4	5	6
ketogluconate.metabolism	РФ+АЦЦП+	-0,54857	0,23735	0,02194	0,99978
fumarate.reductase, procaryotes	РФ+АЦЦП+	-0,02047	0,00911	0,02581	0,99978
succinate.dehydrogenase, procaryotes	РФ+АЦЦП+	-0,34924	0,17200	0,04377	0,99978
photorespiration	РФ+АЦЦП+	1,26120	0,62828	0,04619	0,99978
L.leucine.degradation.I	РФ+АЦЦП+	0,36422	0,18330	0,04843	0,99978

Далее представлены метаболические пути ассоциированные с РФ-позитивной АЦЦП-негативной формой заболевания (таблица 48).

Таблица 48 – Значимые метаболические пути в микробиоме кишечника у пациентов с РФ+АЦЦП- формой РА

Метаболические пути	Форма РА	Коэф.	St_derr	p	q
L.glutamate.degradation.V..via.hydroxyglutarate.	РФ+АЦЦП-	-0,57030	0,24817	0,02269	0,99978
acetyl.CoA.fermentation.to.butan oate'II	РФ+АЦЦП-	-0,57614	0,25909	0,02740	0,99978
mycothiol.biosynthesis	РФ+АЦЦП-	0,52648	0,24320	0,03170	0,99978
pyruvate.fermentation.to.acetone	РФ+АЦЦП-	-0,59523	0,284508	0,03781	0,99978
enterobactin.biosynthesis	РФ+АЦЦП-	0,46143	0,22301	0,03995	0,99978

Следует отметить, что биосинтез энтеробактина, который запускается при недостатке железа, отмечался при РФ-позитивной АЦЦП-негативной форме заболевания. Так же обращает на себя внимание повышение пути деградации глутамата.

Далее представлены метаболические пути, ассоциированные с РФ-негативной АЦЦП-позитивной формой заболевания (таблица 49).

Таблица 49 – Значимые метаболические пути в микробиоме кишечника у пациентов с РФ-АЦЦП+ формой РА

Метаболические пути	Форма РА	Коэффициент	St_derr	p	q
1	2	3	4	5	6
Methylgallate.degradation	РФ-АЦЦП+	-4,61573	1,45143	0,00173	0,99978
Gallate.degradation.II	РФ-АЦЦП+	-4,61596	1,45158	0,00173	0,99978
Toluene.degradation.III..aerobic... Via.p.cresol.	РФ-АЦЦП+	-2,65771	1,11917	0,01860	0,99978
X4.methylcatechol.degradation.. Ortho.cleavage.	РФ-АЦЦП+	-2,45577	1,05530	0,02106	0,99978
Chondroitin.sulfate.degradation	РФ-АЦЦП+	-1,32801	0,57784	0,02268	0,99978
Dermatan.sulfate.degradation	РФ-АЦЦП+	-0,91150	0,40905	0,02708	0,99978
Keratan.sulfate.degradation	РФ-АЦЦП+	-1,471180	0,66384	0,02791	0,99978
Factor.420.biosynthesis	РФ-АЦЦП+	-2,29940	1,04171	0,02854	0,99978

Продолжение таблицы 49

1	2	3	4	5	6
Chlorophyllide.a.biosynthesis .ii. .anaerobic.	РФ-АЦЦП+	-3,42231	1,55371	0,02887	0,99978
Succinate.dehydrogenase, procaryotes	РФ-АЦЦП+	-3,42231	1,55371	0,02887	0,99978
X2.methylcitrate.cycle.I	РФ-АЦЦП+	-1,18497	0,53945	0,029311	0,99978
Superpathway.of.glycol.meta- Bolism. And.degradation	РФ-АЦЦП+	-0,94962	0,43979	0,03213	0,99978
Protocatechuate.degradation.I.. Meta.cleavage.pathway.	РФ-АЦЦП+	-2,62951	1,22333	0,03291	0,99978
Fumarate.reductase, procaryotes	РФ-АЦЦП+	-0,96090	0,46529	0,04032	0,99978

Обращает на себя внимание, что в группе с РФ-АЦЦП+ формой заболевания, отмечается достоверное повышение путей метаболизма глюкозамингликанов, таких как деградация хондроитина, дерматана, кератана, которые присутствуют в костной и хрящевой ткани позвоночных.

Деградация кератана так же была повышена при РФ+АЦЦП+ форме РА. Что может свидетельствовать об участии микробиоты в патогенезе ревматоидного артрита у серопозитивных пациентов.

Следует отметить, что в подгруппах с АЦЦП+РФ- и АЦЦП+РФ+ формами заболевания наблюдалось повышение путей энергетического метаболизма таких веществ, как сукцината и фумарата, участвующих в цикле трикарбоновых кислот.

Далее проведен анализ основных метаболических путей, на основании результатов которого, были выявлены статистически значимые таксоны, ассоциированные с различными формами РА (таблица 50).

Таблица 50 – Значимые таксоны в микробиоме кишечника при различных формах РА

Таксоны	Форма РА	Коэффициент	Stderr	p
1	2	3	4	5
Bacteroidales.Bacteroidaceae. Bacteroides	РА+АСРА-	0.80592	0,21257	0,00020
Lachnospirales. Lachnospiraceae. Dorea	РА+АСРА-	0.75540	0,20673	0,00033
Clostridiales. Lachnospiraceae. Lachnoclostridium	РА+АСРА-	1.81435	0,54399	0,00103
Bacteroidales. Odoribacteraceae.. Butyricimonas	РА+АСРА-	1.8865	0,58735	0,00155
Lachnospirales. Lachnospiraceae. Lachnospiraceae.NK4A136.group	РА+АСРА-	0.60756	0,19132	0,00175
Lachnospirales. Lachnospiraceae. Sellimonas	РА+АСРА-	0.99071	0,32330	0,00251
Lachnospirales. Lachnospiraceae..	РА+АСРА-	0.56626	0,19183	0,00357
Oscillospirales. Ruminococcaceae. Harryflintia	РА+АСРА-	0.571183	0,19188	0,00331

Продолжение таблицы 50

1	2	3	4	5
Erysipelotrichales. Erysipelato clostridiaceae. Asteroleplasma	PA+ACPA+	- 2,62481	0,70343	0,00025
Veillonellales. Selenomonadales. Veillonellaceae. Dialister	PA+ACPA+	2,17067	0,56539	0,00017
Oscillospirales. Oscillospiraceae. Intestinimonas	PA+ACPA+	1,28217	0,36224	0,00051
Burkholderiales.Comamonadaceae. Comamonas	PA+ACPA+	1,33352	0,409366	0,00134
Oscillospirales. UCG.010..	PA+ACPA+	-0,72186	0,23597	0,00255
Peptostreptococcales. Tissierellales. Family. XI. Tissierella	PA+ACPA+	1,07058	0,34619	0,00229
Veillonellales. Selenomonadales. Selenomonadaceae..	PA+ACPA+	0,70658	0,22785	0,00223
Christensenellales....	PA+ACPA+	0,75952	0,25705	0,00354
Lachnospirales. Lachnospiraceae. Sellimonas	PA+ACPA+	0,755339	0,25301	0,00322
Rhizobiales. Pleomorphomonadaceae. Pleomorphomonas	PA-ACPA-	1,48564	0,47186	0,00192
Actinomycetales. Actinomycetaceae..	PA-ACPA+	2,11238	0,53227	0,00010
Victivallales.vadinBE97. Bacteroidales.bacterium.55_9	PA-ACPA+	3,40649	0,89896	0,00020

Следует отметить, что с РФ-негативной АЦЦП-негативной формой заболевания ассоциирован лишь один таксон – Rhizobiales. Pleomorphomonadaceae. Pleomorphomonas.

В дальнейшем нами был проведен MaAsLin 2 в зависимости от наличия антител РФ и АЦЦП при РА, который продемонстрировал снижение таксонов *Lactobacillales. Streptococcaceae, Clostridiales. Ruminococcaceae, Clostridiales. Lachnospiraceae, Oscillospirales. UCG.010* среди АЦЦП- позитивных пациентов РА (рисунок 44).

Significant associations (-log(qval)*sign(coeff))

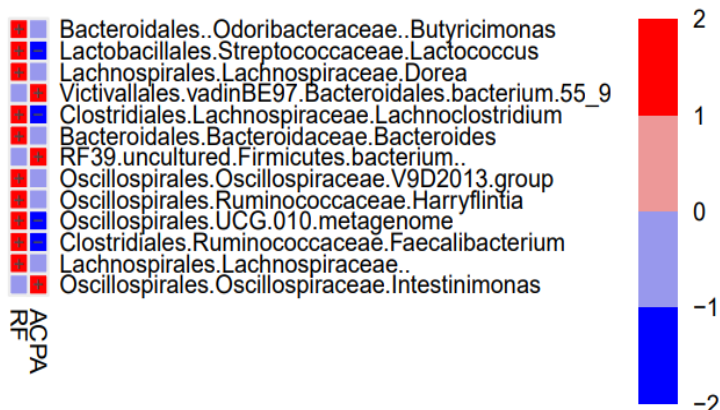


Рисунок 44 – MaAsLin 2 значимых ассоциаций таксонов микробиома кишечника в зависимости от наличия антител РФ и АЦЦП

Далее с помощью MaAsLin 2 были определены ассоциации значимых таксонов при различных формах РА в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рисунок 45.

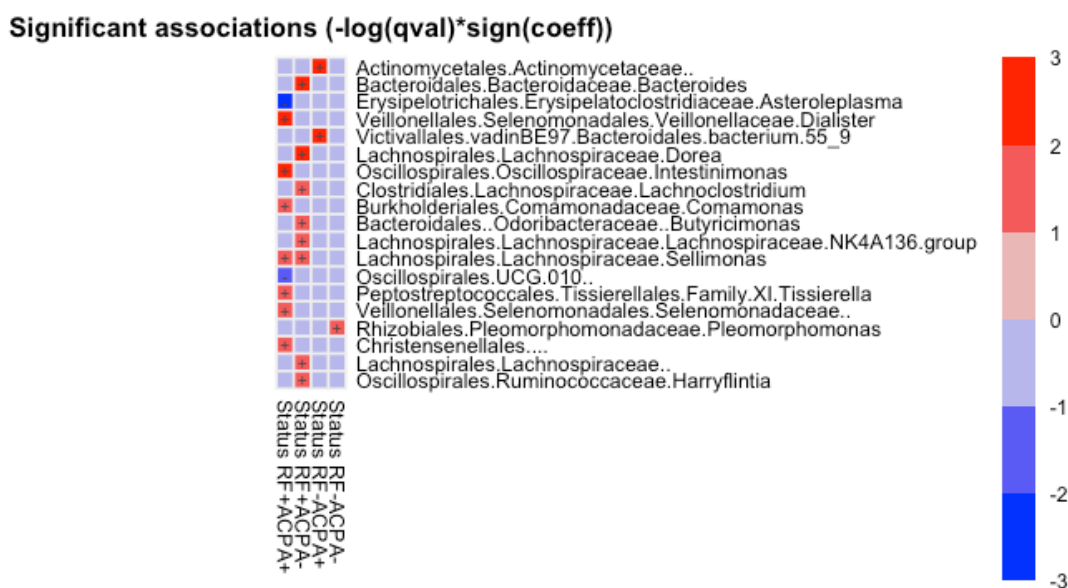


Рисунок 45 – MaAsLin 2 значимых ассоциаций таксонов при различных формах РА в зависимости от РФ и АЦЦП статуса

Так по результатам MaAsLin 2 рост в микробиоме кишечника *Rhizobiales*. *Pleomorphomonadaceae*. *Pleomorphomonas* *Christensenellales* ассоциированы с РФ-негативной АЦЦП-негативной формой РА ($p=0,00192$).

Увеличение *Actinomycetales*. *Actinomycetaceae* ($p=0,00010$) и *Victivallales*. *vadinBE97*. *Bacteroidales*. *bacterium.55_9* ($p=0,00020$) ассоциировано с развитием РФ-негативного АЦЦП-позитивного РА.

Увеличение *Bacteroidales*. *Bacteridaceae*. *Bacteroides* ($p=0,00020$) ассоциировано с РФ-позитивной АЦЦП-негативной формой РА.

Veillonellales. *Selenomonadales*. *Vellionellaceae*. *Dialister* ($p=0,00017$) и *Oscillospirales*. *Oscillospiraceae*. *Intestinimonas* ($p=0,00051$) были ассоциированы с развитием РФ-позитивного АЦЦП-позитивного РА.

В то время как *Erysipelotrichales*. *Erysipelatoclostridiaceae*. *Asteroleplasma* ($p = 0,00025$) с наименьшей частотой встречались при РФ-позитивной АЦЦП-позитивной форме РА.

В дальнейшем нами был проведен анализ энтеротипов в обеих группах исследования (рисунок 46).

Таким образом, при анализе энтеротипов было выявлено преобладание *Ruminococcus* в обеих группах 70 (37,03%), *Bacteroides* 60 (31,75%) в обеих группах исследования, в наименьшем количестве встречался энтеротип *Prevotella* 59 (31,22%).

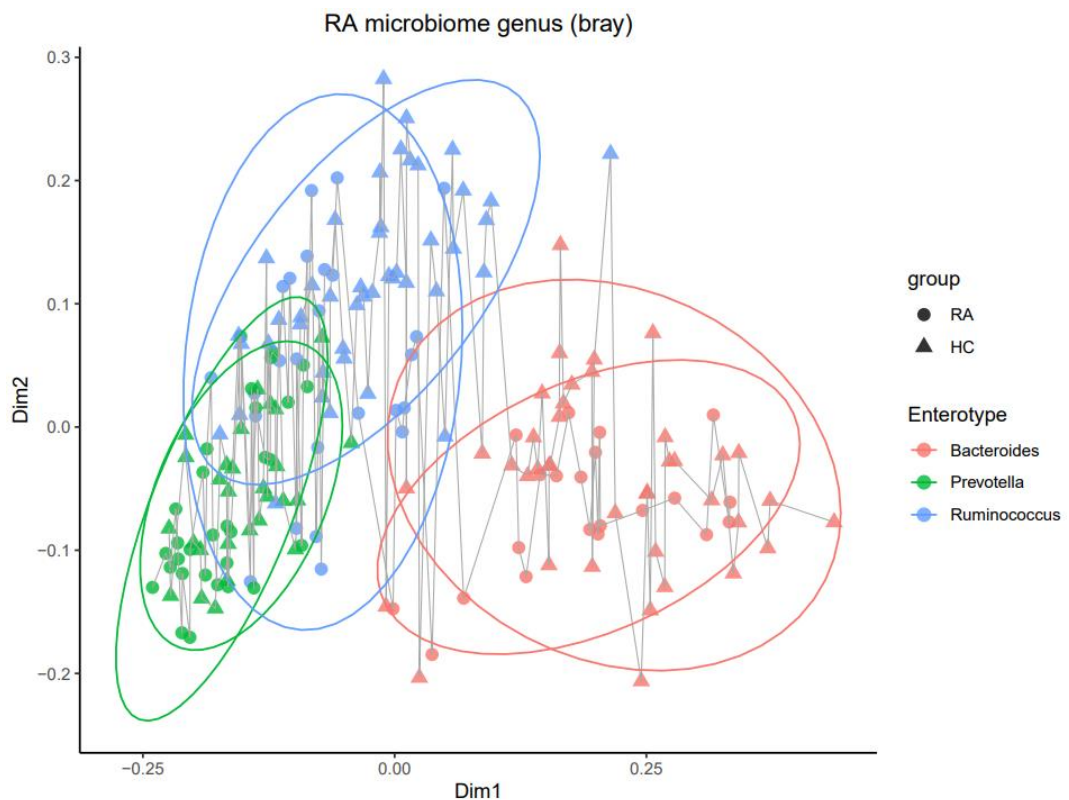


Рисунок 46 – Распределение энтеротипов в исследуемой выборке

Далее нами был проведен анализ частот энтеротипов в основной и контрольной группах исследования (рисунок 47).

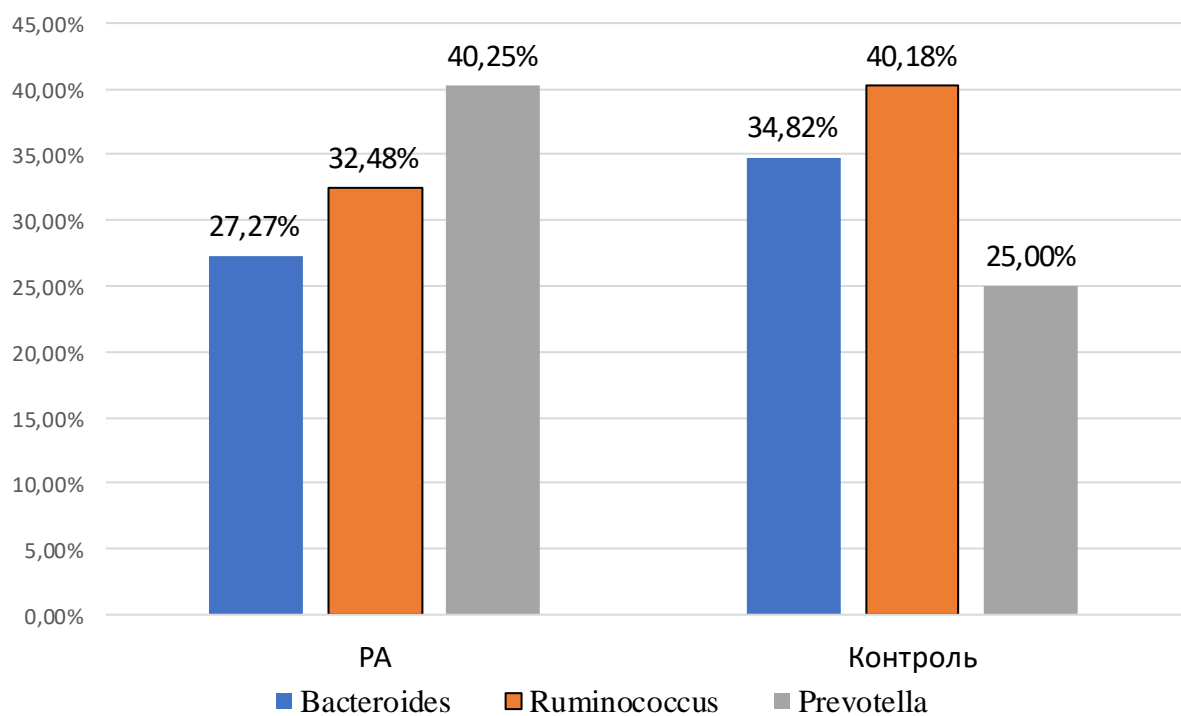


Рисунок 47 – Распределение энтеротипов в основной и контрольной группе исследования

При сравнении частоты энтеротипов в основной и контрольной группах были выявлены статистически значимые различия, $p=0,05^*$. В основной группе исследования превалировал энтеротип *Prevotella*, в контрольной *Ruminococcus*. Наличие энтеротипа *Prevotella* увеличивает шансы развития РА, ОШ=2,056 [95%ДИ: 1,038-5,919].

Далее нами проведен анализ энтеротипов в основной группе исследования, в зависимости от РФ статуса (таблица 51, рисунок 48).

Таблица 51 – Анализ энтеротипов у пациенток с РФ-положительной и РФ-отрицательной формами заболевания

Энтеротип	РФ+, n=60 абс/%	РФ-, n=17 абс/%
<i>Ruminococcus</i>	19 (31,67%)	6 (35,29%)
<i>Bacteroides</i>	18 (30%)	3 (17,65%)
<i>Prevotella</i>	23 (38,33%)	8 (47,06%)

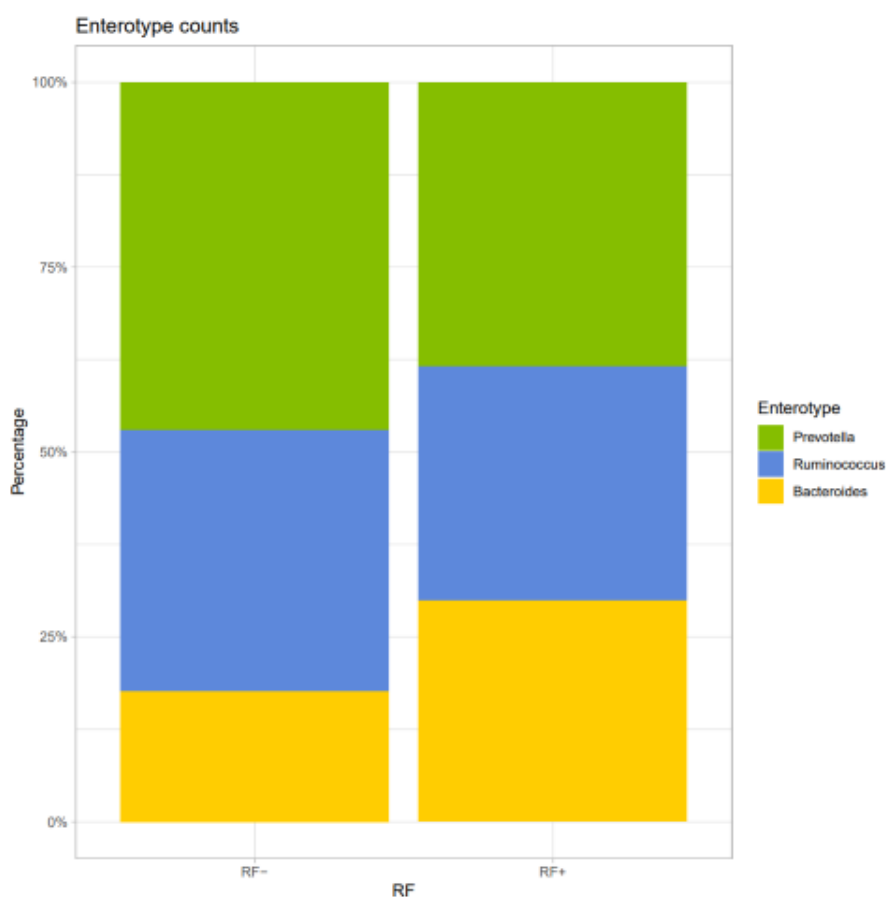


Рисунок 48 – Распределение энтеротипов по РФ статусу

Примечание – RF – РФ; enterotype – энтеротип; percentage – процент

Таким образом, в обеих подгруппах преобладал энтеротип *Prevotella*, у пациентов с РФ-положительной формой заболевания энтеротип *Bacteroides* встречался чаще чем у пациентов с РФ-отрицательной формой РА (рисунок 48), точный тест Фишера не показал статистически значимых различий, $p=0,7347$

Далее представлен сравнительный анализ распределения энтеротипов в зависимости от АЦЦП статуса (таблица 52, рисунок 49).

Таблица 52 – Анализ энтеротипов у пациенток с АЦЦП-положительной и АЦЦП-отрицательной формами заболевания

Энтеротип	АЦЦП+, n=42 абс/%	АЦЦП-, n=35 абс/%
Ruminococcus	13 (30,95%)	12 (34,28%)
Bacteroides	13 (30,95%)	8 (22,86%)
Prevotella	16 (38,1%)	15 (42,86%)

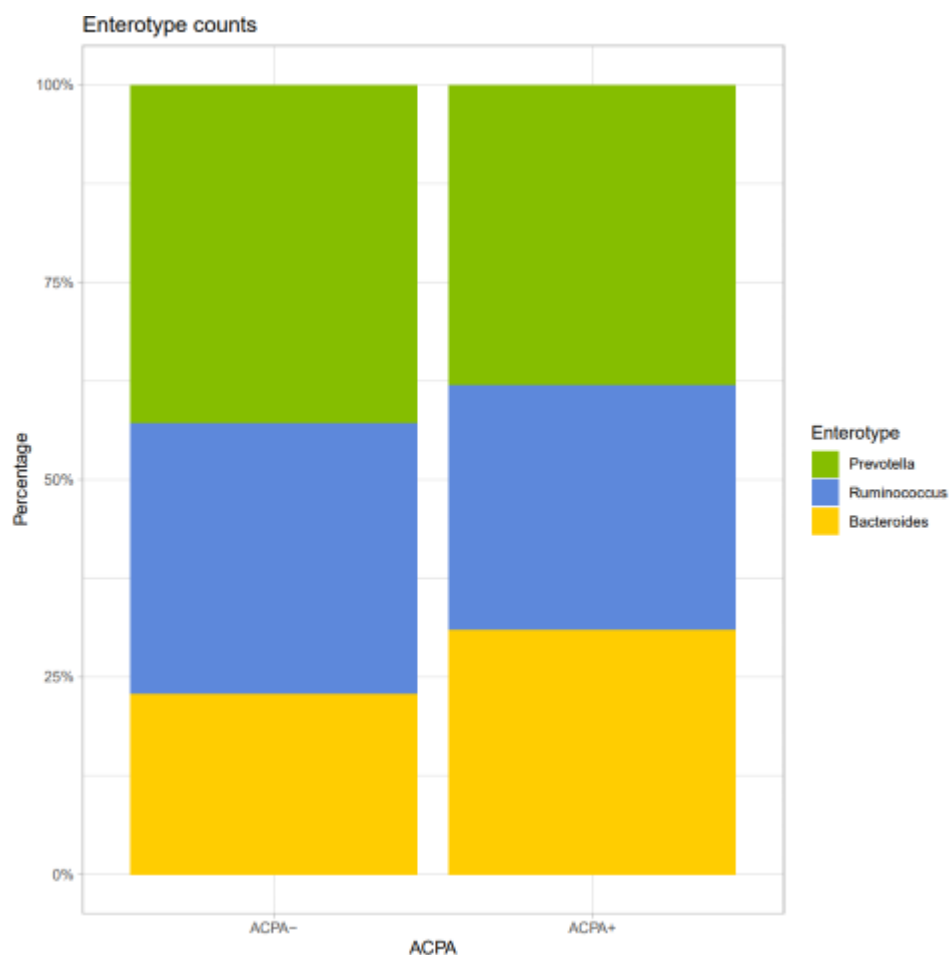


Рисунок 49 – Распределение энтеротипов по АЦЦП статусу

Примечание: АСРА – АЦЦП; enterotype – энтеротип; percentage – процент

При проведении сравнительного анализа распределения энтеротипов между АЦЦП-положительной и АЦЦП-отрицательной формой РА, статистически значимые различия не выявлены, $p=0,4051$.

Таким образом разнообразие микробиома кишечника как внутри сообщества, так и между сообществами не имело статистически значимых различий. Однако микробиом кишечника имел достоверные различия на таксономическом уровне с преобладанием таксонов на уровне семейств:

Bacteroidaceae ($p \leq 0,003$), *Lachnospiraceae* (g. *Dorea*) ($p \leq 0,00001$), *Ruminococcaceae* ($p \leq 0,00002$), и были снижены бактерии семейства *Coriobacteriaceae* ($p \leq 0,01$). Таксон *Rhizobiales. Pleomorphomonadaceae* ассоциирована с РФ-АЦЦП-формой РА, *Actinomycetales. Actinomycetaceae. Victivallales.vadinBE97. Bacteroidales. bacterium.55_9* ассоциированы РФ-АЦЦП+ формой РА, *Bacteroidales. Bacteridaceae. Bacteroides.* ассоциированы с РФ+ АЦЦП-формой РА, *Victivallales. Selenomonadales. Vellionellaceae. Dialister* и *Oscillospirales.Oscillospiraceae. Intestinimonas* ассоциированы РФ+ АЦЦП+ формой РА. Так же были выделены значимые таксоны с рентгенологической стадией, ФК и активностью РА. Анализ энтеротипов выявил значимые различия, преобладание энтеротипа *Prevotella* в основной и *Ruminococcus* в контрольной группе исследования, $p=0,05$, энтеротип *Prevotella* увеличивает шансы развития РА, ОШ = 2,056 (95%ДИ: 1,038-5,919).

3.6 Состояние микробиоценоза ротовой полости и кишечника на фоне терапии ревматоидного артрита

3.6.1 Изучение микробиоценоза ротовой полости на фоне терапии ревматоидного артрита

Нами проведен анализ изменений микробиома ротовой полости на уровне типов на фоне наличия или отсутствия терапии РА (рисунок 50). 67 пациенток получали терапию РА, в то время как 15 пациенток не получали лечение.

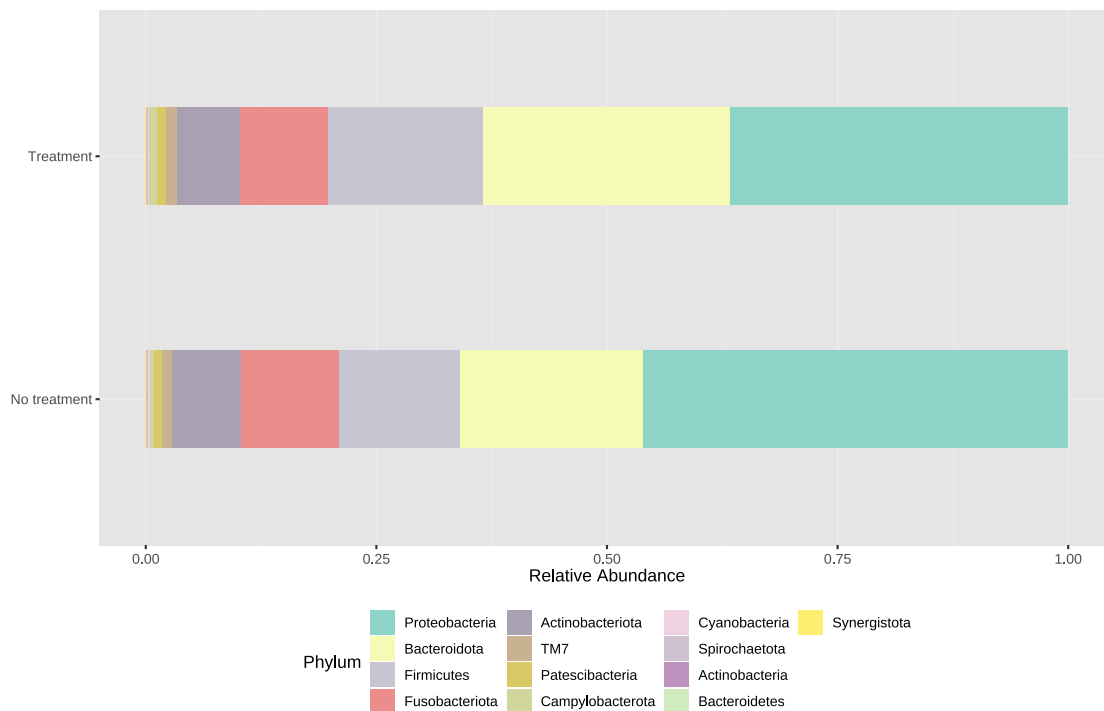
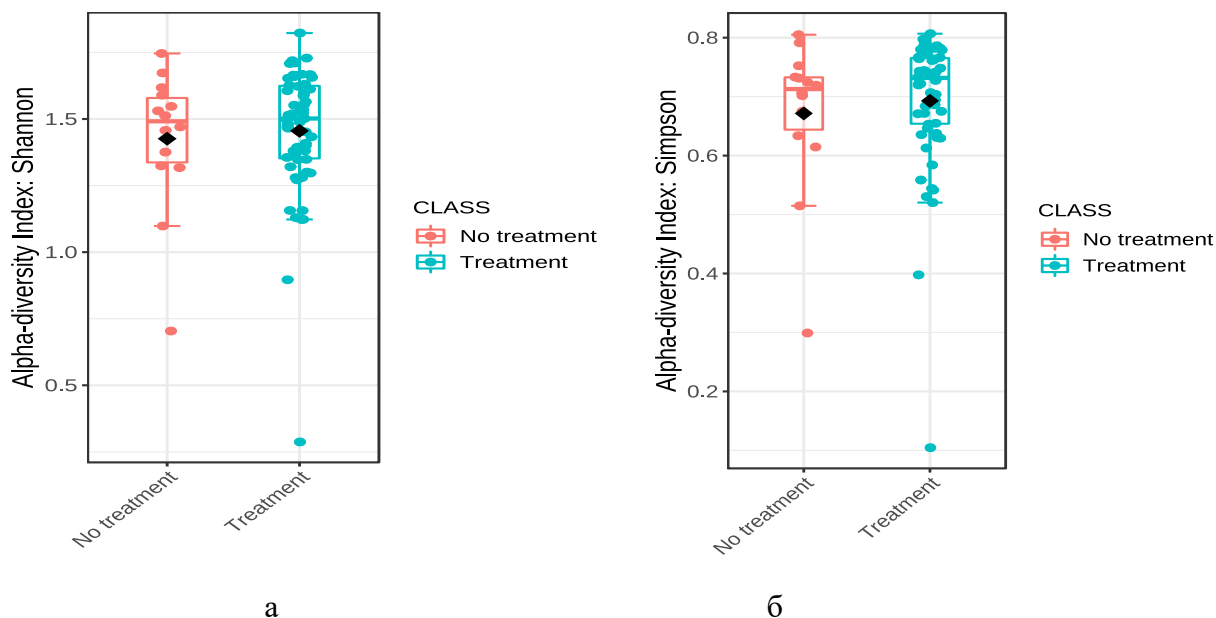


Рисунок 50 – Сравнение изменений микробиома ротовой полости в зависимости от наличия терапии РА на уровне типов

Примечание – Treatment- пациенты РА, получавшие лечение; No treatment- пациенты РА, не получавшие лечение

В группе не получавших лечение РА отмечается большая частота *Proteobacteria*, *Fusobacteria* и *Actinobacteriota*, в то время как в группе, получавшей лечение отмечается более высокая частота *Firmicutes* и *Bacteroidota*.

Далее проведен анализ α -разнообразия микробиома ротовой полости между группами получавших и не получавших терапию РА (рисунок 51).



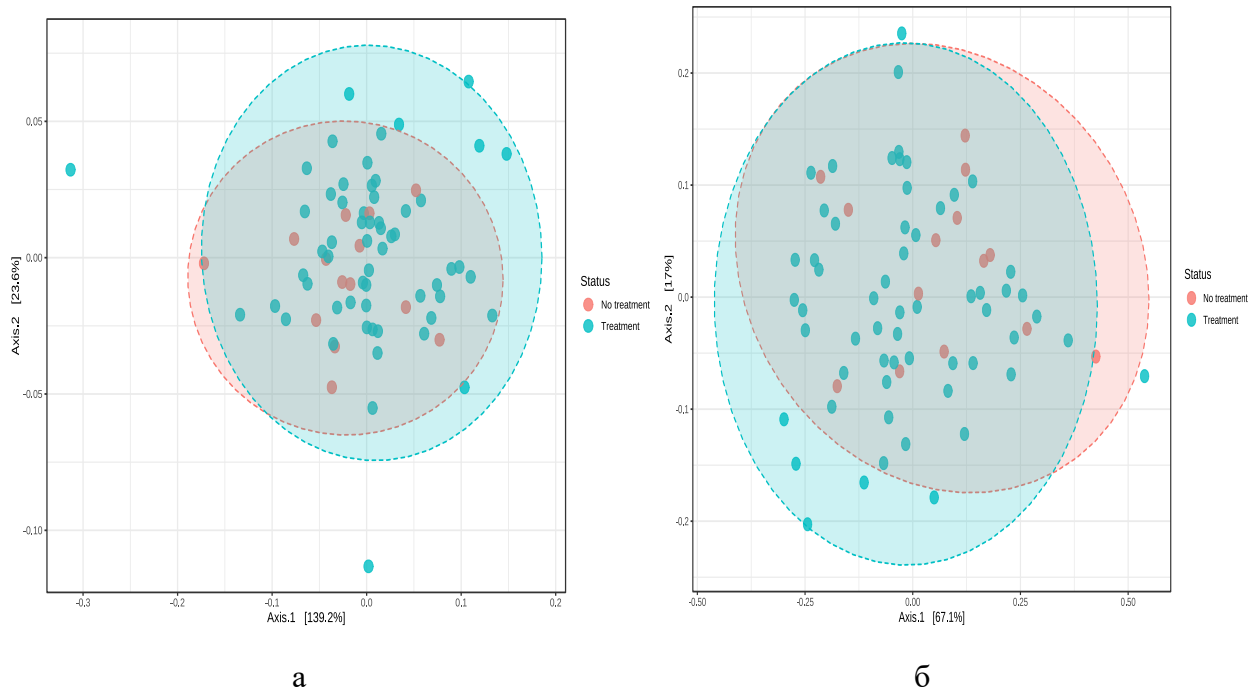
а – индекс Shannon ; б – индекс Simpson

Рисунок 51 – α -разнообразие микробиома ротовой полости в зависимости от наличия терапии РА

Различия α -разнообразия в обеих группах, по индексу Shannon, p-value: 0,76323; [Mann-Whitney] statistic: 391, по индексу Simpson p-value: 0,42044; [Mann-Whitney] statistic: 355. Таким образом, α -разнообразие ротовой полости не имело статистически значимых различий в группе без лечения РА в сравнении с группой получавших терапию РА.

В дальнейшем проведен анализ β -разнообразия микробиома ротовой полости между группами получавшие и не получавшие лечение РА (рисунок 52).

При анализе не были выявлены статистически значимые различия β -разнообразия между группами пациентов принимавших и не принимавших лечение РА по индексу Bray-Curtis F-value: 2,2662; R-squared: 0,03093; p-value: 0,099 и индексу Jensen-Shannon [PERMANOVA] F-value: 2,7825; R-squared: 0,037712; p-value: 0,153.



а – индекс Jensen-Shannon; б – индекс Bray-Curtis

Рисунок 52 – β -разнообразие микробиома ротовой полости в зависимости от наличия терапии РА

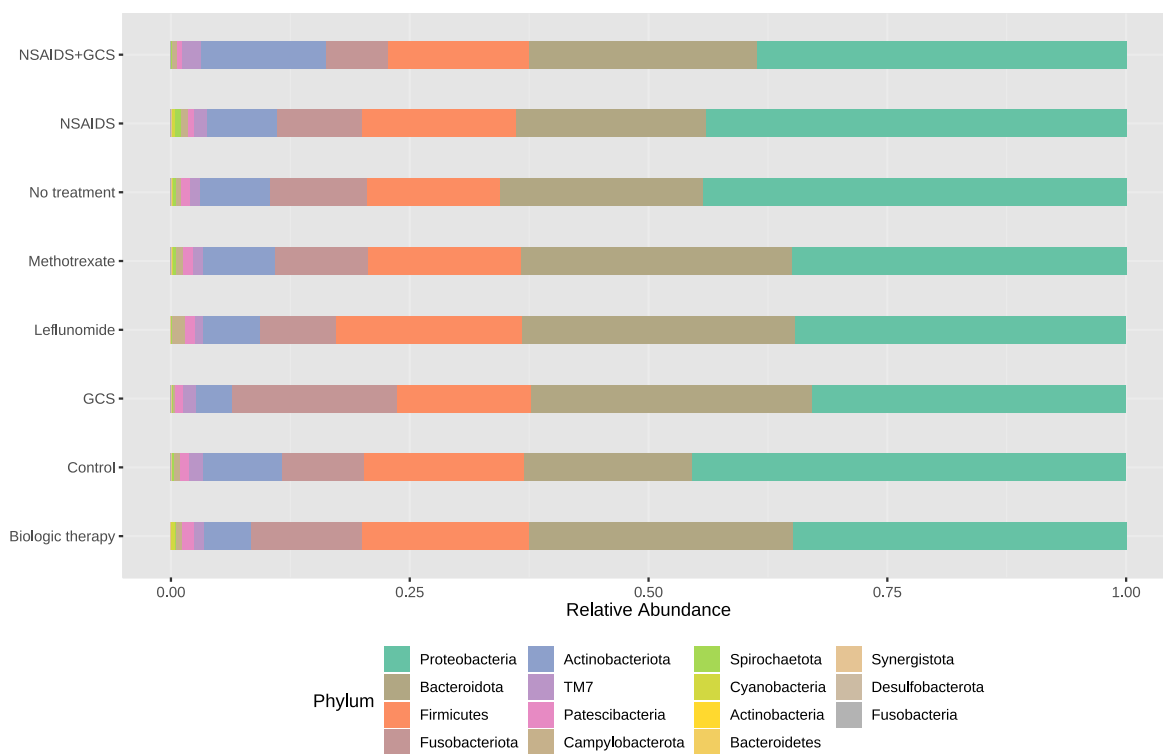


Рисунок 53 – Сравнение микробиома ротовой полости при различных схемах лечения у пациенток РА с контрольной группой исследования на уровне типов

Примечание – Control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide -лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

В соответствии с рисунком 53, проведен анализ микробиома ротовой полости подгрупп с различными схемами лечения РА в сравнении со здоровым контролем на уровне типов бактерий. Из основной группы: метотрексат принимали 25 пациенток, лефлуномид 11, генно-инженерные препараты (Biologic therapy)-7, ГКС-5, НПВС-7, НПВС+ГКС-10. Две пациентки, принимавшие сульфасалазин и гидроксихлорохин были удалены из анализа.

Обращает на себя внимание, что в подгруппе пациенток, принимавших НПВС и ГКС отмечался наибольшая частота Actinobacteriota и TM7, в сравнении с другими подгруппами, в подгруппе пациенток получавших ГКС отмечалась наибольшая частота Fusobacteriota, в сравнении с другими подгруппами. Обращает на себя внимание, что пациентки, принимавшие метотрексат имели схожий по составу микробиом ротовой полости с контрольной группой здоровых лиц.

Далее представлен анализ α -разнообразия микробиома ротовой полости на уровне типов бактерий между подгруппами, принимавших разные схемы лечения РА, не принимавших лечение и здорового контроля (рисунок 54).

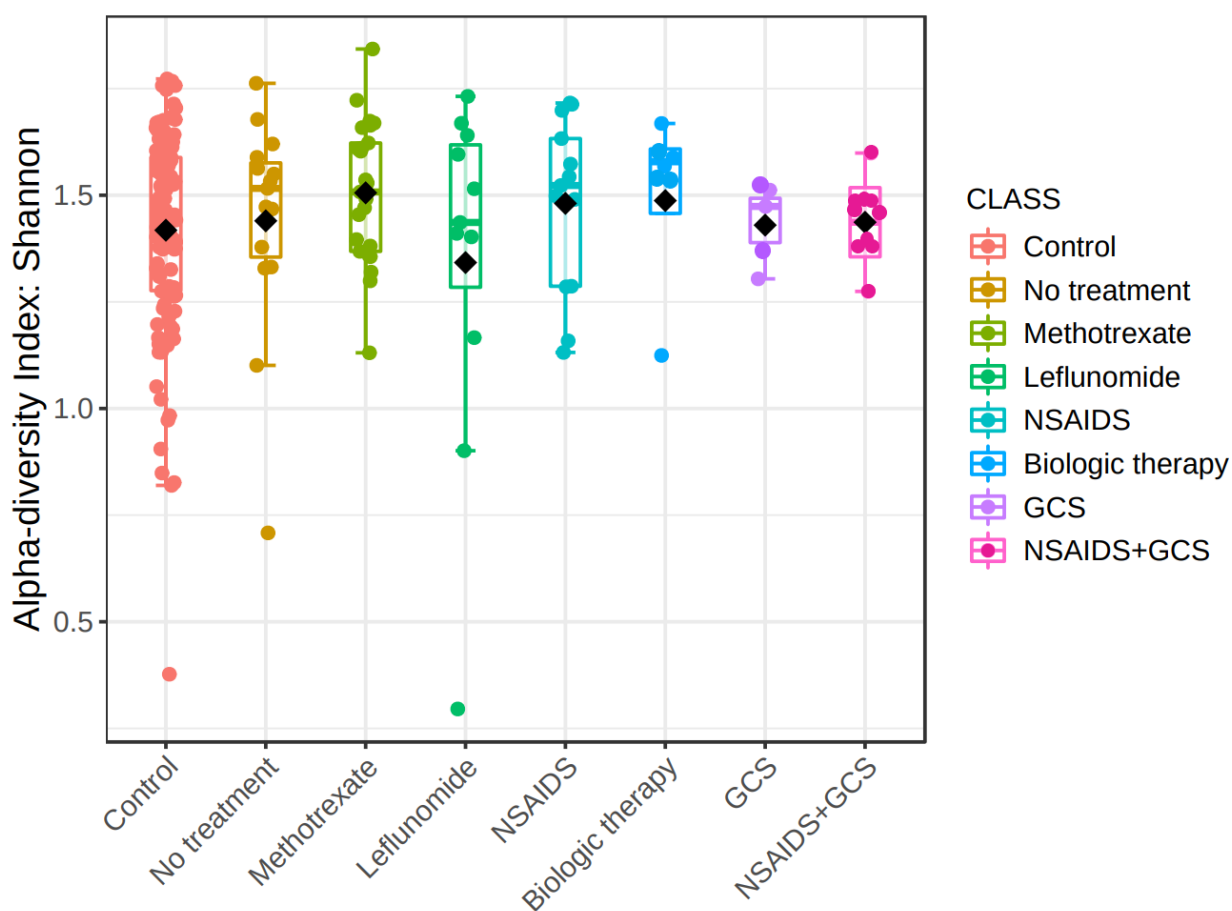


Рисунок 54 – α -разнообразии микробиома ротовой полости в подгруппах в зависимости от схем терапии РА и контрольной группе исследования

Примечание – Control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

По результатам анализа α -разнообразия по индексу Shannon, не были выявлено статистически значимых различий p-value: 0,87614; [Kruskal-Wallis] statistic: 3,0943.

Далее было изучено β -разнообразие микробиома ротовой полости между подгруппами принимавших разные схемы лечения РА, не принимавших лечение и здорового контроля, на уровне типов бактерий (рисунок 55).

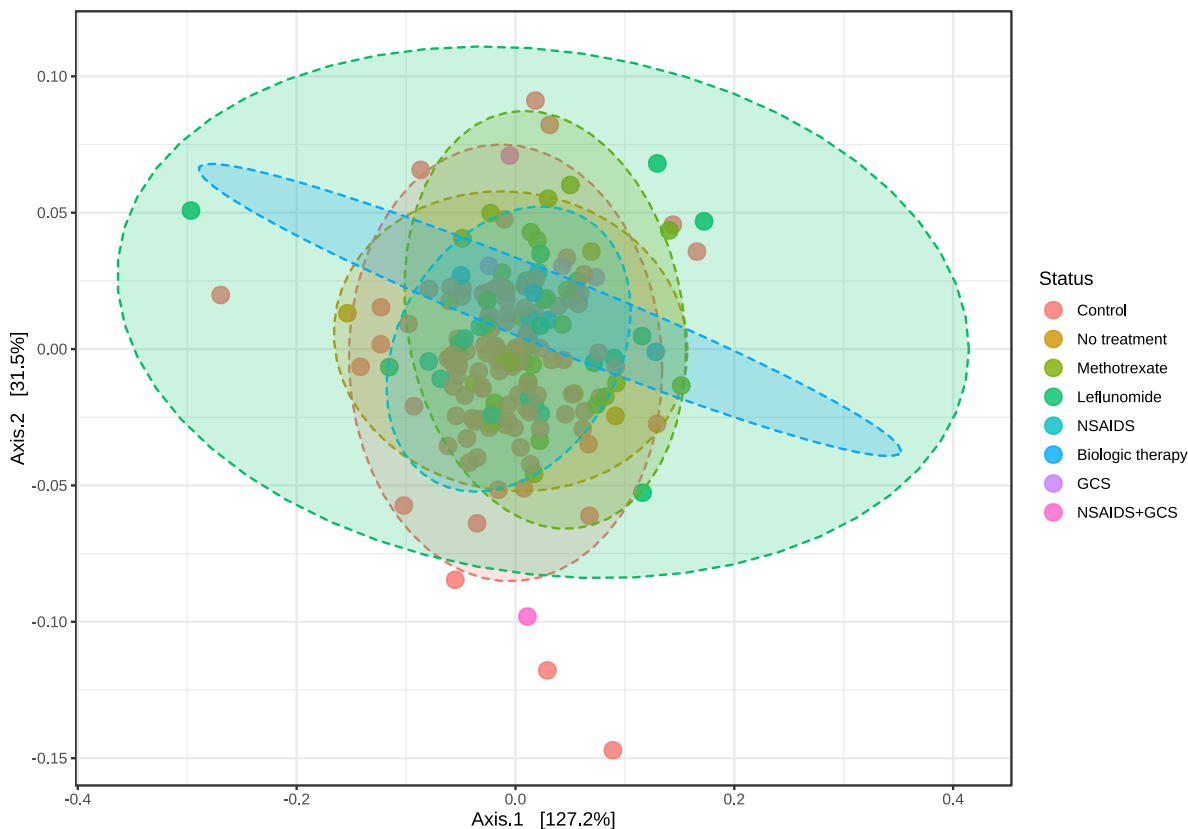


Рисунок 55 – β -разнообразие микробиома ротовой полости в подгруппах в зависимости от схем терапии РА и контрольной группе исследования

Примечание – Control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

При этом не были обнаружены статистически значимые различия β -разнообразия на уровне типов по индексу Bray-Curtis [PERMANOVA] F-value: 0,8296; R-squared: 0,031423; p-value: 0,538.

Таким образом как α так и β - разнообразие микробиоценоза ротовой полости между подгруппами получавших и не получавших лечение РА статистически не различалось, так же не отличалось разнообразие и между подгруппами получавших разные схемы лечение РА. Что дает возможность предположить об отсутствии влияния лечения РА на микробиом ротовой полости. При этом обращают на себя внимание доминирующие таксоны

Actinobacteriota и *TM7* в подгруппах принимавших НПВС и ГКС. Состав микробиома подгруппы получавшей метотрексат наиболее близок к микробиому здорового контроля.

3.6.2 Изучение микробиоценоза кишечника на фоне терапии ревматоидного артрита

Далее проведен анализ изменений микробиома кишечника на уровне типов на фоне наличия или отсутствия терапии РА (рисунок 56).

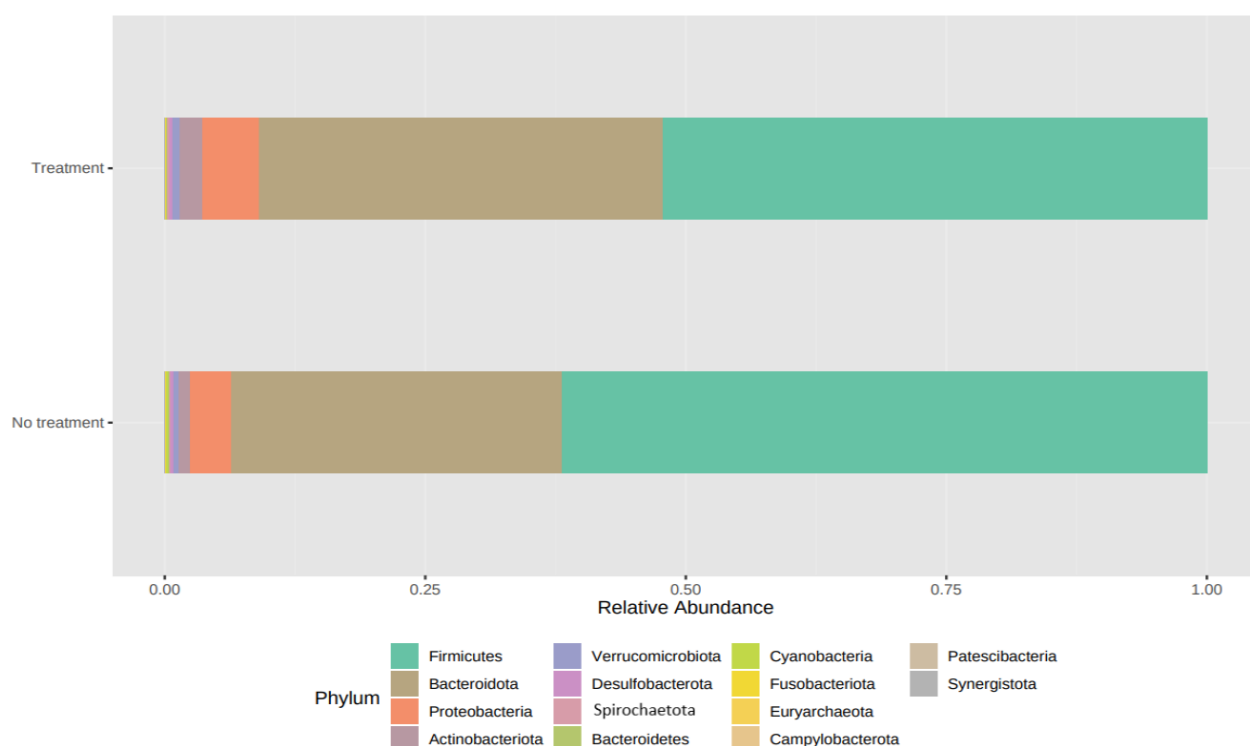


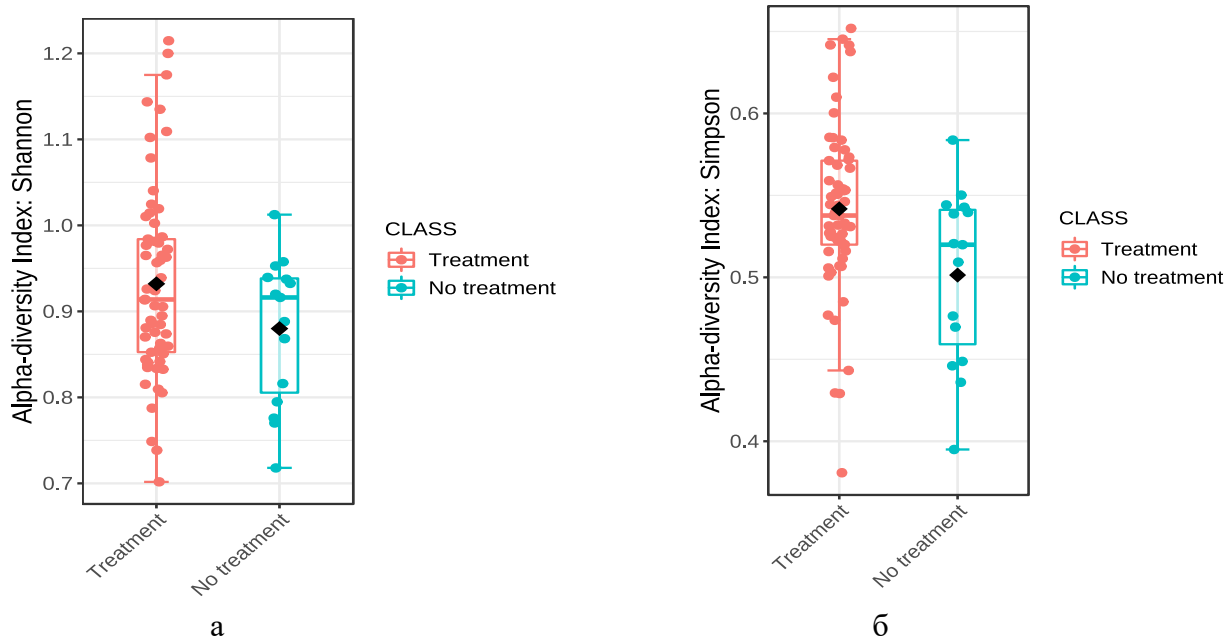
Рисунок 56 – Сравнение изменений микробиома кишечника в зависимости от наличия терапии РА на уровне типов

Примечание – Treatment - пациенты РА, получавшие лечение; No treatment - пациенты РА, не получавшие лечение

В группе не получавших лечение РА отмечается большая частота Firmicutes, в то время как в группе, получавшей лечение отмечается более высокая частота *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Actionobacteriota* и *Verrucomicrobiota*.

Далее проведен анализ α -разнообразия между группами получавших и не получавших терапию РА (рисунок 57).

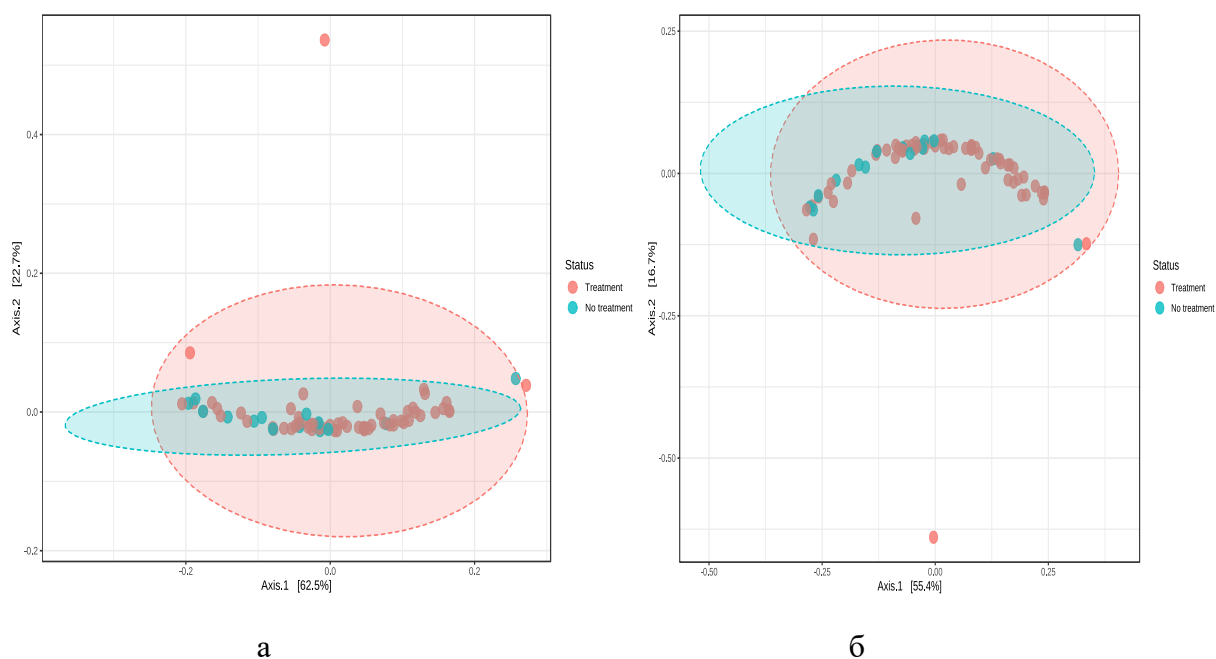
Выявлены статистически значимые различия α -разнообразия в обеих группах, по индексу Shannon, p-value: 0,05; [T-test] statistic: 1,9828 и по индексу Simpson, p-value \leq 0,01; [T-test] statistic: 2,6467. Таким образом α -разнообразие в группе без лечения РА было достоверно ниже, в сравнении с группой получавших терапию РА.



а – индекс Shannon; б – индекс Simpson

Рисунок 57 – α -разнообразие микробиома кишечника в зависимости от наличия терапии РА

Примечание – Treatment - пациенты РА, получавшие лечение; No treatment - пациенты РА, не получавшие лечение



а – индекс Jaccard-Shannon; б – индекс Bray-Curtis

Рисунок 58 – β -разнообразие микробиома кишечника в зависимости от наличия терапии РА

В соответствии с рисунком 58 в дальнейшем проведен анализ β -разнообразия между группами получавшие и не получавшие лечение РА

Были выявлены статистически значимые различия β -разнообразия между группами пациенток принимавших и не принимавших лечение РА по индексу Bray-Curtis, F-value: 2,9742; R-squared: 0,038639; p-value $\leq 0,04$ и индексу Jensen-Shannon, F-value: 3,2114; R-squared: 0,041592; p-value $\leq 0,03$.

Далее проведен анализ подгрупп с различными схемами лечения РА в сравнении со здоровым контролем на уровне типов бактерий (рисунок 59).

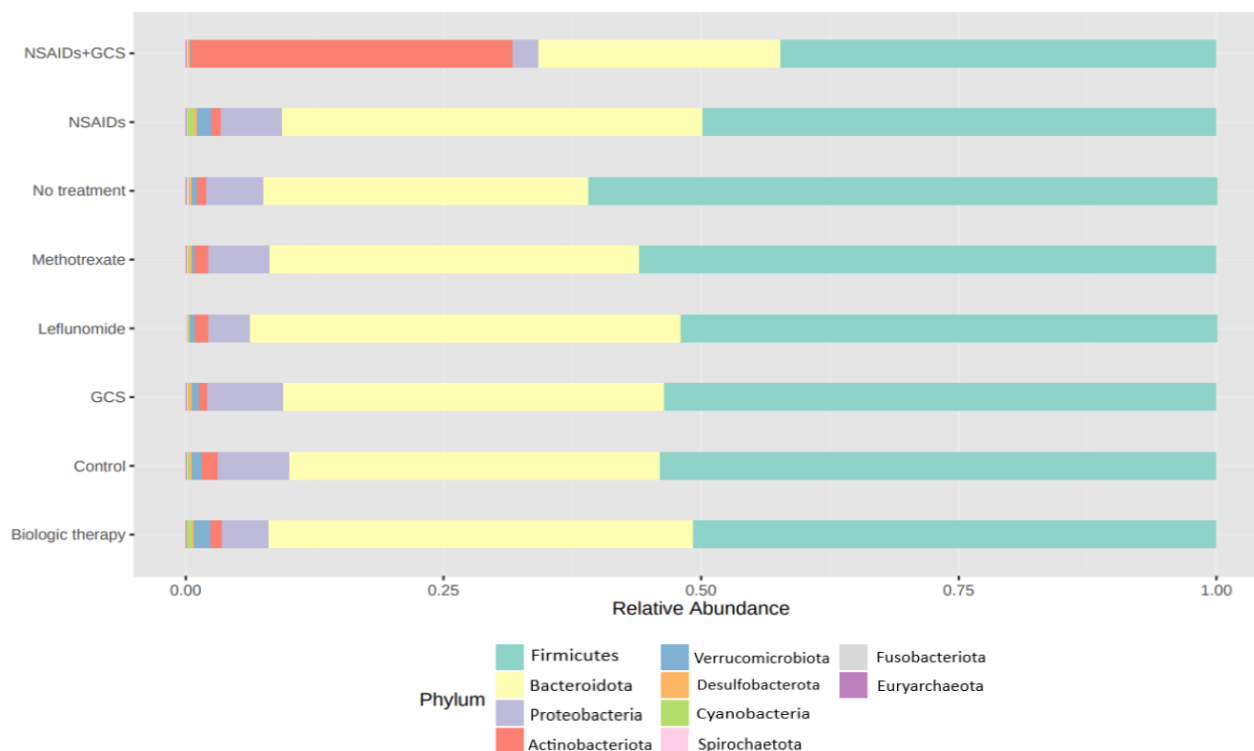


Рисунок 59 – Сравнение микробиома кишечника пациенток с РА при различных схемах лечения с контрольной группой на уровне типов

Примечание – Control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

Обращает на себя внимание, что в подгруппе пациенток, принимавших НПВС и ГКС отмечался рост *Actinobacteriota*, в подгруппе пациенток получавших биологические препараты отмечался рост *Verrucomicrobiota*, так же как и в подгруппе принимавших НПВС. Следует отметить, что пациентки, принимавшие метотрексат имели схожий по составу микробиом с контрольной группой здоровых лиц.

Далее представлен анализ α -разнообразия на уровне типов бактерий между подгруппами принимавших лечение РА, не принимавших лечение и здорового контроля (рисунок 60).

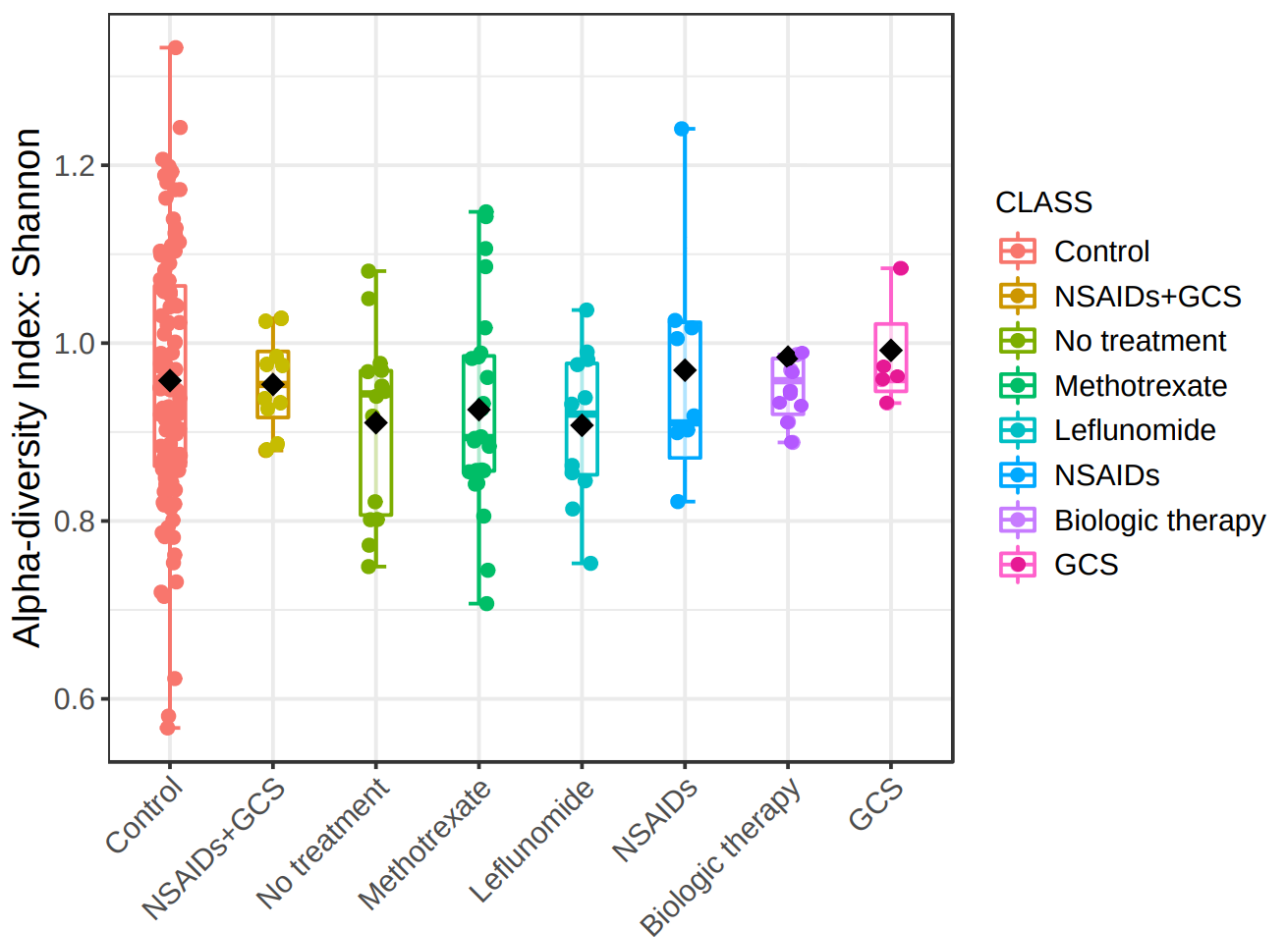


Рисунок 60 – α -разнообразие микробиома кишечника в подгруппах в зависимости от наличия терапии РА и контрольной группе исследования на уровне типов

Примечание – control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

По результатам анализа α -разнообразия по индексу Shannon, не было выявлено статистически значимых различий, p-value: 0,06572; [Kruskal-Wallis] statistic: 5,0222.

Далее было изучено β -разнообразие между подгруппами принимавших лечение РА, не принимавших лечение РА и здорового контроля, на уровне типов бактерий (рисунок 61).

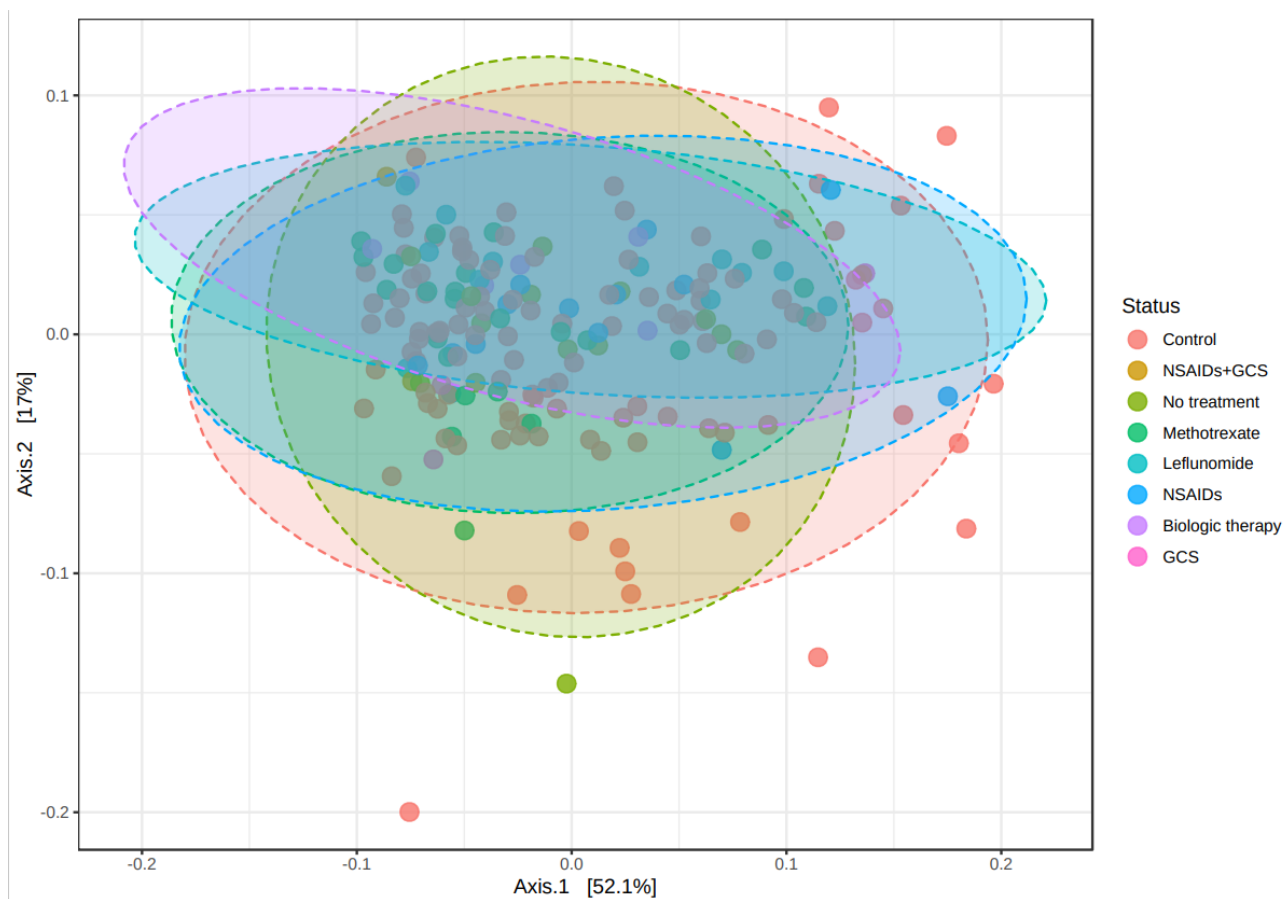


Рисунок б1 – β -разнообразии микробиома кишечника в подгруппах в зависимости от наличия терапии РА и контрольной группе исследования на уровне типов

Примечание – control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

При этом были обнаружены статистически значимые различия β -разнообразия на уровне типов по индексу Bray-Curtis [PERMANOVA] F-value: 3,794; R-squared: 0,12795; p-value $\leq 0,01$.

В дальнейшем нами был проведен анализ микробиома кишечника подгрупп, с различными видами лечения на уровне рода (рисунок б2).

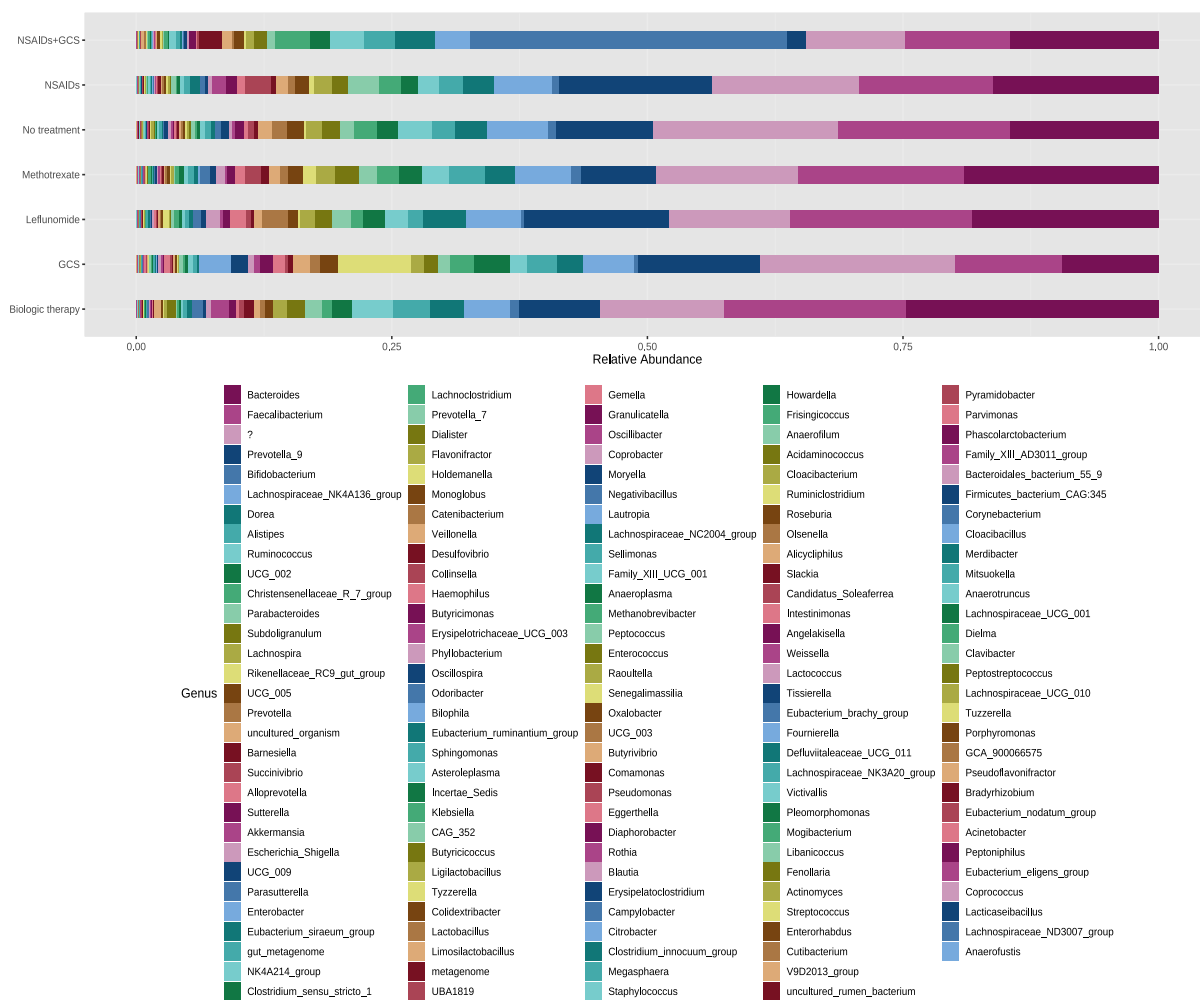


Рисунок 62 – Сравнение микробиома кишечника при различных схемах лечения РА на уровне рода

Примечание – NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - отсутствие лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

Обращает на себя внимание рост *g_Bifidobacterium* в подгруппе принимавших симптоматическую терапию в виде комбинации НПВС и ГКС.

Далее осуществлен анализ α -разнообразия микробиома кишечника на уровне рода между подгруппами на фоне различных схем лечения РА (рисунок 63).

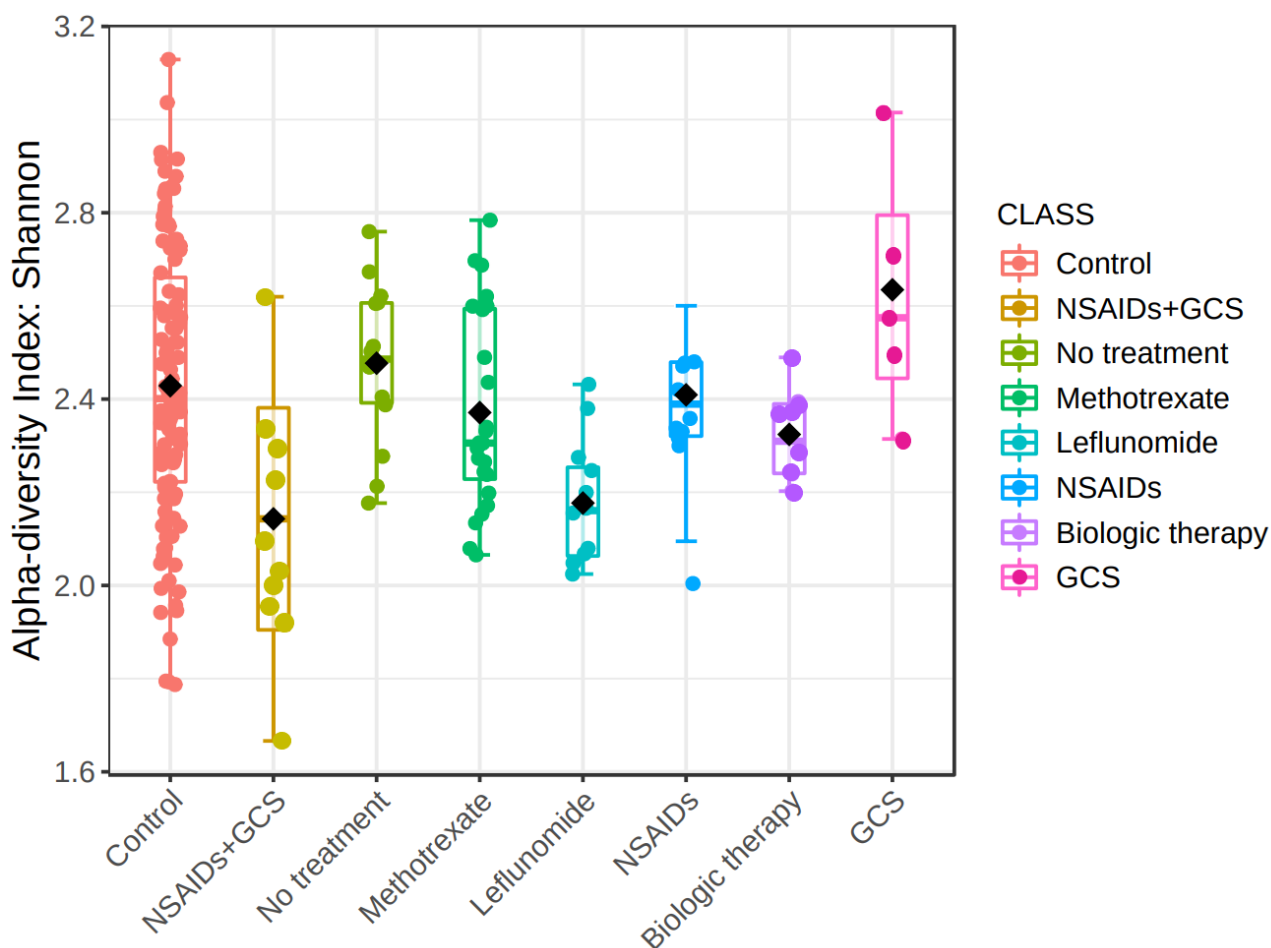


Рисунок 63 – α -разнообразие кишечника в подгруппах в зависимости от схем терапии РА на уровне рода

Примечание – Control - контрольная группа исследования; NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

Были выявлены статистически значимые различия α -разнообразия микробиома кишечника на уровне рода между подгруппами на фоне различных схем лечения РА по индексу Shannon, p -value $\leq 0,013403$; [Kruskal-Wallis] statistic: 16,066.

В дальнейшем нами проведен анализ β -разнообразия микробиома кишечника на уровне рода между подгруппами на фоне различных схем лечения РА (рисунок 64).

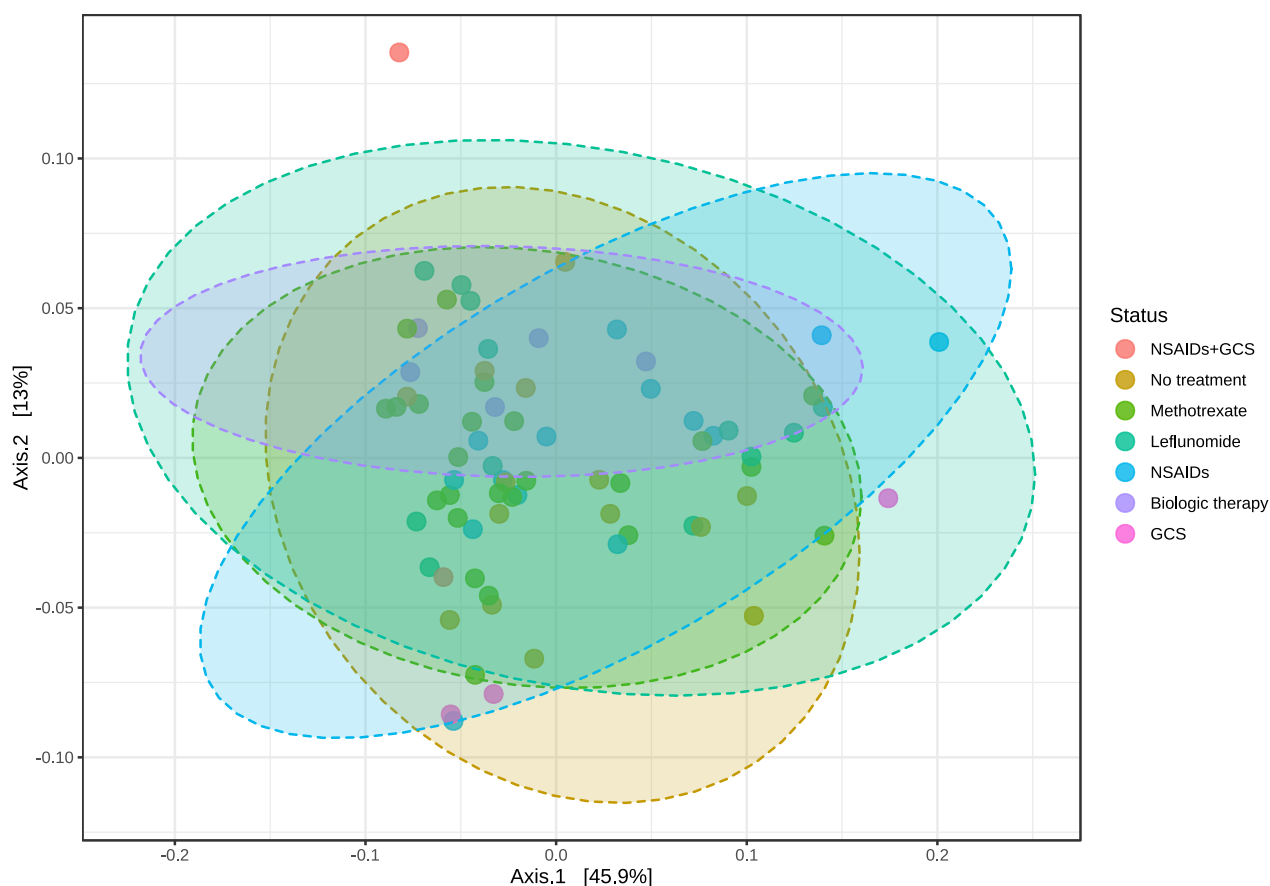


Рисунок 64 – β -разнообразие микробиома кишечника в подгруппах в зависимости от схем терапии РА на уровне рода

Примечание – NSAIDs - НПВС; GCS - ГКС; no treatment - нет лечения; methotrexate - метотрексат; leflunomide - лефлуномид; biologic therapy - биологическая терапия

Были выявлены статистически значимые различия β -разнообразия микробиома кишечника на уровне рода, между подгруппами на фоне различных схем лечения РА, по индексу Bray-Curtis, [PERMANOVA] F-value: 1,8665; R-squared: 0,14321; p-value $\leq 0,017$.

Таким образом α и β - разнообразие микробиоценоза кишечника между группами получавших и не получавших лечение РА статистически различались, так же, как и β - разнообразие между подгруппами получавших разные схемы лечения РА на уровне типов, более того были обнаружены статистически значимые различия α и β - разнообразия между подгруппами получавших разные схемы лечения РА на уровне рода. Что дает возможность предположить о существенном влиянии лечения РА на микробиом кишечника. При этом обращают на себя рост *g_Bifidobacterium* в подгруппе принимавших симптоматическую терапию в виде комбинации НПВС и ГКС. Состав микробиома кишечника подгруппы получавшей метотрексат наиболее близок к микробиому здорового контроля.

3.7 Прогнозирование клинического течения у исследованных больных ревматоидным артритом

В дальнейшем на основании полученных результатов был проведен мультиномиальный дискриминантный анализ для прогнозирования такой конечной точки, как стадия рентгенологического поражения суставов. В качестве независимых факторов были отобраны количественные переменные такие как возраст исследуемых женщин на момент осмотра, возраст дебюта заболевания, длительность РА, ЧБС, ЧПС, ВАШ пациента и врача, баллы по шкале DAS, количество беременностей и родов, а также длительность кормления грудью в анамнезе, а также лабораторные показатели активности заболевания. В результате проведенного дискриминантного анализа с помощью метода шагового отбора на 2 шаге была получена дискриминантная модель (рисунок 65), представляющая собой систему из уравнений (1) и (2).

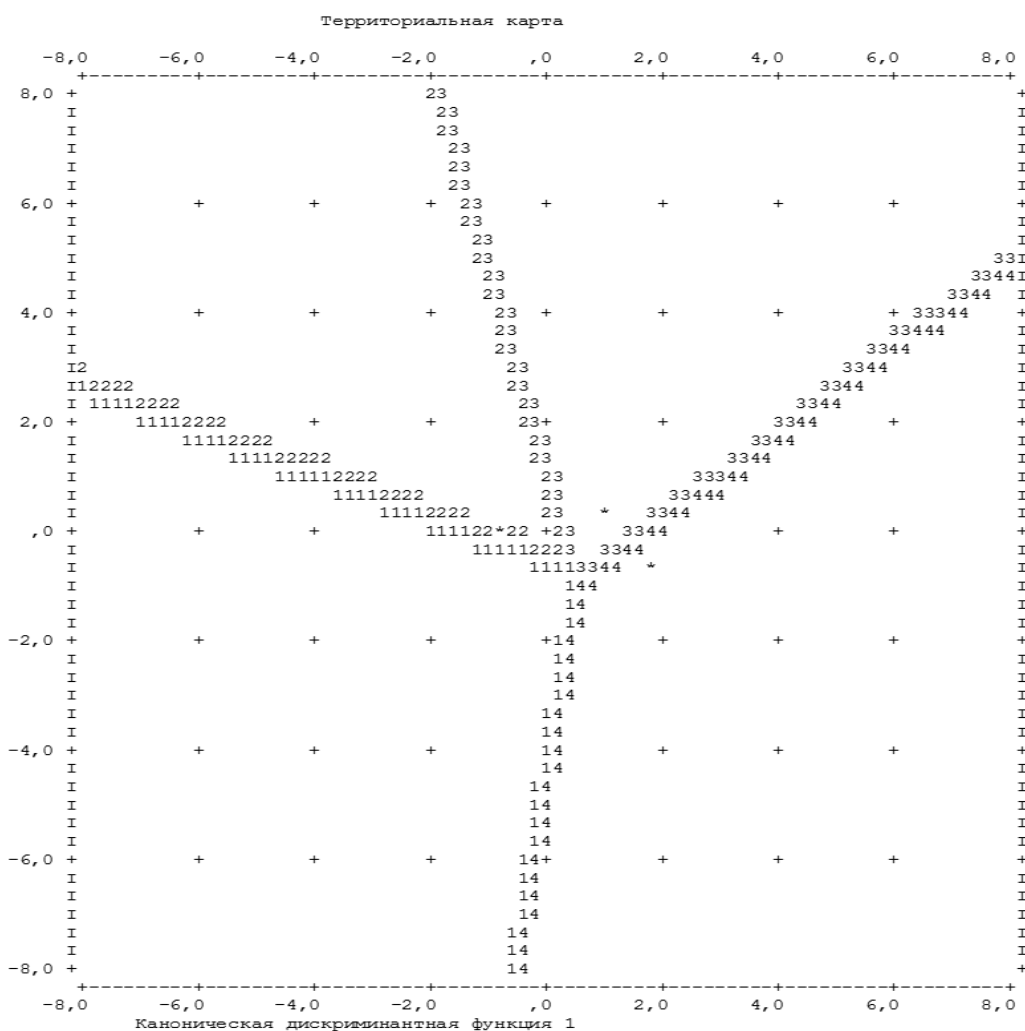


Рисунок 65 – Территориальная карта мультиномиального дискриминантного анализа рентгенологической стадии

$$F1 = -1,635 + 0,037 * X_{\text{СРБ}} + 0,144 * X_{\text{длитРА}} \quad (1)$$

$$F2 = 0,117 + 0,071 * X_{\text{СРБ}} - 0,078 * X_{\text{длитРА}} \quad (2)$$

где F1 – значение дискриминантной функции 1;
 F2 – значение дискриминантной функции 2;
 X_{СРБ} – СРБ(мг/л);
 X_{длитРА} – длительность РА (лет).

Таким образом, полученная дискриминантная модель позволяет прогнозировать стадию рентгенологического поражения сустава при расчете координат функций F1 и F2 на территориальной карте, где прогнозируемая стадия окажется в точке пересечения осей x и y. Чувствительность полученной модели (в том числе после перекрестной проверки) при прогнозировании I рентгенологической стадии РА составила 71,6%, II стадии – 29,4%, III стадии – 37,5% и IV стадии – 63,6%.

В дальнейшем нами был проведен анализ бинарной логистической регрессии с целью прогнозирования развития другой конечной точки, как деформация суставов. В качестве независимых факторов были отобраны возраст исследуемых женщин, возраст дебюта заболевания, ЧБС, ЧПС, DAS-28, ВАШ пациента и врача, суставные и внесуставные осложнения заболевания, а также симметричность поражение сустава (рисунок 66).

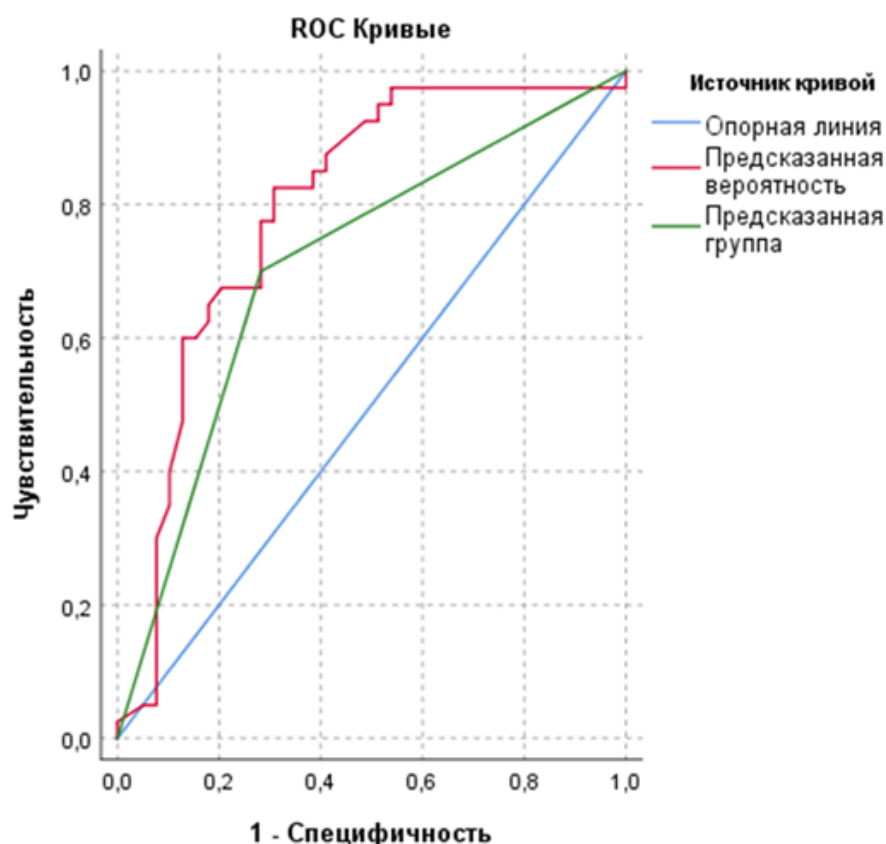


Рисунок 66 – ROC-анализ прогностической модели деформаций суставов

$$p=1/(1+e^{-z}) \quad (3)$$

где

$$z=1,891+ X_{\text{воздб}} \times -0,099+ X_{\text{сим}} \times 2,015 \quad (4)$$

где Хвоздеб – возраст дебюта заболевания;

Хсим – симметричное поражение суставов.

Полученная модель показала достаточную площадь под кривой как для предсказанной вероятности, так и для предсказанной группы (таблица 53).

Таблица 53 – ROC-анализ, площади под кривой

Переменные результата проверки	Область	Стандартная ошибка	Асимптоматическая значимость	Асимптоматический 95% доверительный вариант	
				нижняя граница	верхняя граница
Предсказанная вероятность	0,795	0,053	0,000	0,692	0,899
Предсказанная группа	0,709	0,059	0,000	0,593	0,825

Полученная модель оценки вероятности развития деформации крупных и мелких суставов у пациентов, страдающих РА женского пола с порогом классификации равным 0,5 позволяет выявить группу женщин с высоким риском развития деформации и обладает чувствительностью теста 71,7%, специфичностью 70%, диагностической точностью 70,8%.

Таким образом на вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов имеют достоверное влияние возраст дебюта и симметричность суставного синдрома, в то время как на формирование рентгенологической стадии оказывают влияние уровень СРБ и длительность заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующее поражением суставов, а также развитием внесуставных проявлений. Частота РА составляет 1% в мировой популяции.

На сегодняшний день доказана роль эндогенных и экзогенных факторов в развитии РА. Генетическая предрасположенность является важным эндогенным фактором, который в наибольшей степени взаимодействует с экзогенными триггерами. В последние десятилетия исследования общегеномных ассоциаций (GWAS) предоставили возможность глубоко изучить генетическую предрасположенность к РА. Так же актуальны исследования, направленные на изучение триггеров, приводящих к активации того или иного гена РА. Микробиоценоз является одним из ведущих факторов, занимающий существенную нишу в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в том числе РА. Исследований, посвященных данной области в Казахстане нами найдено не было.

В связи с этим нами было инициировано исследование, в рамках которого осуществлен рекрутинг основной группы исследования в количестве 82 и контрольной группы исследования, в количестве 114 человек в г. Астана (Нұр-Султан) с учетом соблюдения мер инфекционной безопасности по Covid-19. Всем включенным в исследование участникам проводился осмотр, сбор анамнестических данных заболевания и жизни, а также воздействие возможных триггеров РА. Всем респондентам проводились общеклинические методы исследования с определением показателей ОАК, ОАМ, ряда биохимических показателей, белковых фракций, ревматоидного фактора, АЦЦП, а также определение антител к компонентам SS-A (Ro) и SS-B (La). Осуществлен забор биоматериала в виде слюны, кала и крови у всех участников исследования для последующего выделения ДНК.

По клиническим и лабораторным данным участников исследования был проведен анализ, продемонстрировавший особенности клинического течения РА различной формы в зависимости от РФ и АЦЦП статуса. Так же были проанализированы данные опросников FFQ и осуществлено прогнозирование клинического течения у исследованных больных ревматоидным артритом.

В результате выделения ДНК из образцов крови и проведением ПЦР в реальном времени, в последующем был проведен SNP-анализ, который выявил статистически значимое преобладание определенных нуклеотидов при РА и различных формах РА. Не было обнаружено значимых ассоциаций между демографическими, клиническими и лабораторными характеристиками пациентов с РА и частотами 17 единичных нуклеотидных полиморфизмов, вошедших в анализ.

В результате выделения ДНК из образцов слюны и кала, и последующего секвенирования 16SpPHK был проведен биоинформатический анализ микробиома ротовой полости и кишечника, в результате которого были выявлены статистически значимые различия между основной и контрольной

группой, на основе исследования α и β -разнообразия на уровне OTU. В результате таксономической идентификации бактериального сообщества были выявлены доминировавшие в основной группе бактерии, а также определены их ассоциации с клиническими параметрами РА, так же были проанализированы изменения микробиома ротовой полости и кишечника на фоне лечения РА и проведен анализ по распределению энтеротипов.

Таким образом, проведенное нами исследование позволило сделать следующие **выводы**:

1. У исследованных пациенток с РФ-позитивной формой ревматоидного артрита рентген стадия ($\chi^2=9,928$, $df=3$, $p=0,0019$) и частота развития деформаций ($\chi^2=4,995$, $df=1$, $p=0,025$) была достоверно выше, также данной форме заболевания характерны прямые корреляционные связи СРБ, альбумина, гамма и бета 2 глобулинов различной силы с активностью заболевания по DAS 28. У пациенток с АЦЦП-позитивной формой заболевания, так же достоверно выше была частота деформаций ($\chi^2=6,017$, $df=1$, $p=0,014$).

2. Исследованные женщины с РА достоверно меньше употребляли продукты, содержащие лактозу ($p=0,003$), ниацин ($p=0,006$), алкоголь ($p=0,006$), полиненасыщенные жирные кислоты ($p=0,004$), витамин Е ($p=0,001$).

3. У исследованных пациенток с РА достоверно выше носительство гена HLA-DRB9 rs9268839 (ОШ=3,67 [95% ДИ: 1,58-8,54], $p=0,001$), при этом у больных с РФ-позитивной формой РА доминировал С/Т генотип нуклеотида RASGRP1 rs8032939, у пациенток с РФ-негативной формой Т/Т генотип RASGRP1 rs8032939, и А/Т-Т/Т генотипы SYNGR1 rs909685. В АЦЦП-позитивной форме доминировали Т/Т генотипы нуклеотидов PADI4 rs2240340a и STAT4 rs11889341, G/Т генотип FCRL3 rs2317230, в АЦЦП-негативной форме РА доминировали С/Т генотипы нуклеотидов PADI4 rs2240340a и STAT4 rs11889341.

4. Установлены значительные отличия микробиома пациентов с РА в сравнении со здоровым микробиомом. У пациенток с РА выявлены значимые различия таксонов в микробиоме в зависимости от РФ и АЦЦП статуса, рентгенологической стадии, ФК и активности заболевания. Определено, что лица, принадлежащие к энтеротипу *Prevotella* имеют высокие шансы развития РА, (ОШ = 2,056 [95%ДИ: 1,038- 5,919], $p=0,05$). В кишечном микробиоме на уровне семейств преобладали *Bacteroidaceae* ($p\leq 0,003$), *Lachnospiraceae* (g. *Dorea*) ($p\leq 0,00001$), *Ruminococcaceae* ($p\leq 0,00002$), и были снижены бактерии семейства *Coriobacteriaceae* ($p\leq 0,01$).

5. Выявлены статистически значимые различия α -разнообразия микробиома ротовой полости по индексам Шеннона ($p\leq 0,021$) и Симпсона ($p\leq 0,002$). В микробиоме ротовой полости группы РА преобладали таксоны на уровне семейств *Prevotellaceae* ($p\leq 0,0001$) и *Neisseriaceae* ($p\leq 0,00001$), на уровне родов *Porphyromonas* ($p\leq 0,001$).

6. Показатели кишечного микробиома в отличии от микробиома ротовой полости являются индикатором эффективности терапии: индекс Шеннона, $p\leq 0,05$; индекс Симпсона, $p\leq 0,01$ и индекс Bray-Curtis, $p\leq 0,04$. При этом состав

микробиома кишечника подгруппы, получавшей метотрексат, достоверно сопоставим с микробиомом здорового контроля, индекс Bray-Curtis $p \leq 0,01$.

7. При расчете прогностической модели выявлено, что на вероятность развития деформаций мелких и крупных суставов влияют возраст дебюта и симметричность суставного синдрома (чувствительность теста 71,7%, специфичность 70%, диагностическая точность 70,8%), в то время как на формирование рентгенологической стадии влияет уровень СРБ и длительность заболевания (чувствительность модели при прогнозировании I рентгенологической стадии – 71,6%, II стадии – 29,4%, III стадии – 37,5% и IV стадии – 63,6%).

Практические рекомендации:

1. Данные о генетических и микробиомных маркерах будут задепонированы в международной базе научно-технической информации, и таким образом дополнят мировые данные о генетической предрасположенности к РА и микробиоме при РА, в частности в Центральной Азии.

2. Пациентам с РА рекомендуется полноценное питание с достаточным уровнем витамина E, ниацина, полиненасыщенных жирных кислот, молочных продуктов.

3. Наличие полиморфизма HLA-DRB9 rs9268839 у пациентов азиатской популяции может использоваться в прогнозировании развития ревматоидного артрита при наличии триггеров.

4. Возраст дебюта РА и симметричность суставного синдрома необходимо учитывать при использовании предложенного расчета вероятности развития деформаций мелких и крупных суставов, а в формировании рентгенологической стадии - уровень СРБ и длительность заболевания, что позволит предотвращать инвалидизацию в трудоспособном возрасте

5. По результатам исследования базисная терапия метотрексатом подтвердила свою эффективность в отношении микробиома при РА.

6. Для повышения терапевтической эффективности, пациентам с РА необходимо назначать курсами пробиотикотерапию препаратами, содержащими бифидобактерии.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis // *Lancet*. Elsevier Ltd. – 2016. – Vol. 388, №10055. – P. 2023-2038.
- 2 Favalli E.G., Biggioggero M. et al. Sex and Management of Rheumatoid Arthritis // *Clin Rev Allergy Immunol*. – 2019. – Vol. 56, №3. – P. 333-345.
- 3 Sokka T., Toloza S., Cutolo M. et al. QUEST-RA Group. Women, men, and rheumatoid arthritis: analyses of disease activity, disease characteristics, and treatments in the QUEST-RA study // *Arthritis Res Ther*. – 2009. – Vol. 11, №1. – P. R7-1-R7-20.
- 4 Dadoun S., Zeboulon-Ktorza N., Combescure C. et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis // *Joint Bone Spine*. – 2013. – Vol. 80, №1. – P. 29-33.
- 5 Cross M., Smith E., Hoy D. et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study // *Ann Rheum Dis*. – 2014. – Vol. 73, №7. – P. 1316-1322.
- 6 Firestein G.S., McInnes I.B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis // *Immunity*. Cell Press. – 2017. – Vol. 46, №2. – P. 183-196.
- 7 Viatte S., Barton A. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response // *Semin Immunopathol*. – 2017. – Vol. 39, №4. – P. 395-408.
- 8 Kurkó J., Besenyei T., Laki J. et al. Genetics of rheumatoid arthritis - A comprehensive review // *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. – 2013. – Vol. 45, №2. – P. 170-179.
- 9 Prasad P., Kumar A. et al. Caucasian and Asian specific rheumatoid arthritis risk loci reveal limited replication and apparent allelic heterogeneity in north Indians // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, №2. – P. e31584-1-e31584-11.
- 10 Stahl E.A., Raychaudhuri S., Remmers E.F. et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci // *Nat Genet*. – 2010. – Vol. 42, №6. – P. 508-514.
- 11 Yamamoto K., Okada Y., Suzuki A. et al. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia-present and future // *Nat Rev Rheumatol*. – 2015. – Vol. 11, №6. – P. 75-79.
- 12 Okada Y., Wu D., Trynka G. et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery // *Nature*. – 2014. – Vol. 506, №7488. – P. 376-381.
- 13 Tobón G.J., Youinou P., Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis // *J. Autoimmun*. Elsevier Ltd. – 2010. – Vol. 35, №1. – P. 10-14.
- 14 Kuranov A.B., Vavilov M.N., Abil'dinova G.Zh. et al. HLA class II genes and rheumatoid arthritis in the Kazakh Population // *Immunologiya*. – 2015. – Vol. 37, №4. – P. 188-193.
- 15 Kuranov A.B., Vavilov M.N., Abildinova G.Zh. et al. Polymorphisms of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 in inhabitants of astana, the capital city of Kazakhstan // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №12. – P. e115265-1-e115265-17.
- 16 Plant D., Flynn E., Mbarek H. et al. Investigation of potential non-HLA

rheumatoid arthritis susceptibility loci in a European cohort increases the evidence for nine markers // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69, №8. – P. 1548-1553.

17 Perricone C., Ceccarelli F., Valesini G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story // *Autoimmun. Rev.* – 2011. – Vol. 10, №10. – P. 599-608.

18 Bax M., van Heemst J. et al. Genetics of rheumatoid arthritis: What have we learned? // *Immunogenetics.* – 2011. – Vol. 63, №8. – P. 459-466.

19 Guzman I.P., Navarro-zarza E., Gutie I.A. PADI2 Polymorphisms Are Significantly Associated With Rheumatoid Arthritis, Autoantibodies Serologic Status and Joint Damage in Women from Southern Mexico // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 718246-1-718246-18.

20 Kwon Y.C., Lim J., Bang S.Y. et al. Genome-wide association study association study in a Korean population identifies six novel susceptibility loci for rheumatoid arthritis. – 2020. – Vol. 79, №11. – P. 1438-1445.

21 Allam I. et al. Association Study of PTPN22 (rs2476601) and PADI4 (rs2240340) Polymorphisms with Rheumatoid Arthritis in Algerian Population // *J. Clin. Cell. Immunol.* – 2020. – Vol. 1, №1. – P. 1000586-1-1000586-7.

22 Baños-Hernández C.J., Navarro-Zarza J.E., Parra-Rojas I. et al. PADI4 polymorphisms and the functional haplotype are associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility: A replication study in a Southern Mexican population // *Hum Immunol.* – 2017. – Vol. 78, №9. – P. 553-558.

23 Aslam M.M., John P., Fan K.H. et al. Investigating the GWAS-Implicated Loci for Rheumatoid Arthritis in the Pakistani Population // *Dis. Markers.* – 2020. – Vol. 2020. – 1910215-1-1910215-11.

24 Issilbayeva A., Kushugulova A. et al. Epidemiological Trends of Rheumatoid Arthritis and PADI4, PTPN22, and HLA-DRB9 Genes Distribution in the Kazakhstan Population // *OAMJMS.* – 2021. – Vol. 9. – P. 747-757.

25 Gevers D., Knight R., Petrosino J.F. et al. The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome // *PLoS Biol.* – 2012. – Vol. 10, №8. – P. 6-10.

26 Nikitakis N.G., Papaioannou W., Sakkas L. et al. The autoimmunity–oral microbiome connection // *Oral Dis.* – 2017. – Vol. 23, №7. – P. 828-839.

27 Lynch S.V., Pedersen O. The human intestinal microbiome in health and disease // *New England Journal of Medicine.* Massachusetts Medical Society. – 2016. – Vol. 375, №24. – P. 2369-2379.

28 Schloissnig S., Arumugam M., Sunagawa S. et al. Genomic variation landscape of the human gut microbiome // *Nature.* – 2013. – Vol. 493, №7430. – P. 45-50.

29 Maeda Y., Takeda K. Role of Gut Microbiota in Rheumatoid Arthritis // *J. Clin. Med.* MDPI AG. – 2017. – Vol. 6, №6. – P. 60-1-60-9.

30 Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time // *Science.* – 2012. – Vol. 326, №5960. – P. 1694-1697.

31 Demoruelle M.K., Deane K.D., Holers V.M. When and where does

inflammation begin in rheumatoid arthritis? // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2014. – Vol. 26, №1. – P. 64-71.

32 Gómez-Bañuelos E. et al. Rheumatoid Arthritis-Associated Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* // *J. Clin. Med. Rev.* – 2019. – Vol. 8, №9. – P. 1309-1-1309-42.

33 Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: Etiological association // *Mod. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 19, №5. – P. 453-456.

34 Hitchon C.A., Chandad F., Ferucci E.D. et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives // *J. Rheumatol.* – 2010. – Vol. 37, №6. – P. 1105-1112.

35 Teng F., Klinger C.N., Felix K.M. et al. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells // *Immunity*. Elsevier Inc. – 2016. – Vol. 44, №4. – P. 875-888.

36 Bodkhe R., Balakrishnan B., Taneja V. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment // *Ther Adv Musculoskelet Dis.* – 2019. – Vol. 11. – P. 1-25.

37 Scher J.U., Sczesnak A., Longman R.S. et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis // *Elife*. – 2013. – Vol. 2. – P. e01202-1-e01202-33.

38 Maeda Y., Kurakawa T. et al. Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine // *Arthritis Rheumatol.* John Wiley and Sons Inc. – 2016. – Vol. 68, №11. – P. 2646-2661.

39 Marietta E.V., Murray J.A., Luckey D.H. et al. Suppression of Inflammatory Arthritis by Human Gut-Derived *Prevotella histicola* in Humanized Mice // *Arthritis Rheumatol.* John Wiley and Sons Inc. – 2016. – Vol. 68, №12. – P. 2878-2888.

40 Ceccarelli F., Orrù G., Piloni A. et al. *Porphyromonas gingivalis* in the tongue biofilm is associated with clinical outcome in rheumatoid arthritis patients // *Clin Exp Immunol.* – 2018. – Vol. 194, №2. – P. 244-252.

41 Kishikawa T., Maeda Y., Nii T. et al. Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population // *Ann Rheum Dis.* – 2020. – Vol. 79, №1. – P. 103-111.

42 Jeong Y., Kim J.W., You H.J. et al. Gut Microbial Composition and Function Are Altered in Patients with Early Rheumatoid Arthritis // *J. Clin. Med.* – 2019. – Vol. 8, №5. – P. 693-1-693-13.

43 Wolff B., Berger T., Frese C. et al. Oral status in patients with early rheumatoid arthritis: A prospective, case-control study // *Rheumatol.* – 2014. – Vol. 53, №3. – P. 526-531.

44 Chen B., Zhao Y., Li S. et al. Variations in oral microbiome profiles in rheumatoid arthritis and osteoarthritis with potential biomarkers for arthritis screening // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 17126-1-17126-14.

45 Zhang X., Zhang D., Jia H. et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment // *Nat. Med.*

Nature Publishing Group. – 2015. – Vol. 21, №8. – P. 895-905.

46 Lorenzo D., GianVincenzo Z., Carlo Luca R. et al. Oral – Gut Microbiota and Arthritis : Is There an Evidence-Based Axis ? // J Clin Med. – 2019. – Vol. 8, №10. – P. 0-1-0-18.

47 du Teil Espina M., Gabarrini G., Harmsen H.J.M. et al. Talk to your gut : the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis // FEMS Microbiol Rev. – 2019. – Vol. 43, №1. – P. 1-18.

48 Prodan A., Levin E., Nieuwdorp M. Does disease start in the mouth, the gut or both?: Oral bacteria colonize the gut more frequently than previously thought // Elife. eLife Sciences Publications Ltd. – 2019. – Vol. 8. – P. e45931-1-e45931-4.

49 Гульнева М.Ю. Микробиоценоз кишечника у больных системными заболеваниями соединительной ткани и системными васкулитами: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.39. – Ярославль, 2007. – 182 с.

50 Wang L., Wang F.S., Gershwin M.E. Human autoimmune diseases: A comprehensive update // J. Intern. Med. – 2015. – Vol. 278, №4. – P. 369-395.

51 Ногаева М.Г., Аманжолова А.С., Тулеутаева С.А. Распространенность ревматоидного артрита в Республике Казахстан за 2013-2017 годы // Медицина. – 2019. – №3(201). – С. 77-82.

52 Almoallim H., Al Saleh J., Badsha H. et al. A Review of the Prevalence and Unmet Needs in the Management of Rheumatoid Arthritis in Africa and the Middle East // Rheumatol Ther. – 2021. – Vol. 8, №1. – P. 1-16.

53 Safiri S., Kolahi A.A., Hoy D. et al. Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017 // Ann. Rheum. Dis. – 2019. – Vol. 78, №11. – P. 1463-1471.

54 Alamanos Y., Voulgari P.V., Drosos A.A. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review // Semin. Arthritis Rheum. – 2006. – Vol. 36, №3. – P. 182-188.

55 Kvien T.K., Uhlig T., Ødegård S. et al. Epidemiological aspects of rheumatoid arthritis: The sex ratio // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2006. – Vol. 1069. – P. 212-222.

56 van der Woude D., van der Helm-van Mil A.H.M. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. Elsevier Ltd. – 2018. – Vol. 32, №2. – P. 174-187.

57 Jawaheer D., Hetland M.L. Sex Differences in Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Early and Established Rheumatoid Arthritis – Results from the DANBIO registry // J Rheumatol. – 2012. – Vol. 39, №1. – P. 46-53.

58 Flouri I., Markatseli T.E., Voulgari P.V. et al. Comparative effectiveness and survival of in fl iximab , adalimumab , and etanercept for rheumatoid arthritis patients in the Hellenic Registry of Biologics : Low rates of remission and 5-year drug survival // Semin. Arthritis Rheum. – 2014. – Vol. 43, №4. – P. 447-457.

59 Forslind K., Hafström I., Ahlmén M. et al. Sex : a major predictor of remission in early rheumatoid // Ann Rheum Dis. – 2007. – Vol. 66, №1. – P. 46-52.

60 Lora V., Cerroni L., Cota C. Skin manifestations of rheumatoid arthritis //

G. Ital. di Dermatologia e Venereol. – 2018. – Vol. 153, №2. – P. 243-255.

61 An J.J., Nyarko E., Hamad M.A. Prevalence of comorbidities and their associations with health-related quality of life and healthcare expenditures in patients with rheumatoid arthritis // Clin. Rheumatol. Clinical Rheumatology. – 2019. – Vol. 38, №10. – P. 2717-2726.

62 Myasoedova E., Crowson C.S., Kremers H.M. et al. Is the incidence of rheumatoid arthritis rising? Results from Olmsted County, Minnesota, 1955-2007 // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62, №6. – P. 1576-1582.

63 Crowson C.S., Matteson E.L., Myasoedova E. et al. The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases // Arthritis Rheum. – 2011. – Vol. 63, №3. – P. 633-639.

64 Vos T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 // Lancet. – 2015. – Vol. 386, №9995. – P. 743-800.

65 Smolen J.S., Aletaha D., Barton A. et al. Rheumatoid arthritis // Nat Rev Dis Primers. – 2018. – Vol. 4. – P. 18001-1-18001-23.

66 Minichiello E., Semerano L., Boissier M.C. Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: A systematic literature review // Jt. Bone Spine. Société française de rhumatologie. – 2016. – Vol. 83, №6. – P. 625-630.

67 Silman A.J., Ollier W., Holligan S. et al. Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population // J Rheumatol. – 1993. – Vol. 20, №4. – P. 618-622.

68 Batko B., Stajszczyk M., Świerkot J. et al. Prevalence and clinical characteristics of rheumatoid arthritis in Poland: A nationwide study // Arch. Med. Sci. Termedia Publishing House Ltd. – 2019. – Vol. 15, №1. – P. 134-140.

69 Otón T., Carmona L. The epidemiology of established rheumatoid arthritis // Best Pract Res Clin Rheumatol. – 2019. – Vol. 33, №5. – P. 101477.

70 Rudan I., Sidhu S., Papana A. et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in low- and middle-income countries: A systematic review and analysis. // J. Glob. Health. – 2015. – Vol. 5, №1. – P. 010409-1-010409-15.

71 Roux C.H., Saraux A., Le Bihan E. et al. Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathies: Geographical variations in prevalence in France // J. Rheumatol. – 2007. – Vol. 34, №1. – P. 117-122.

72 Zlatković-Švenda M.I., Stojanović R.M., B Šipetić-Grujičić S., Guillemin F. Prevalence of rheumatoid arthritis in Serbia // Rheumatol. Int. – 2014. – Vol. 34, №5. – P. 649-658.

73 Rossini M., Rossi E., Bernardi D. et al. Prevalence and incidence of rheumatoid arthritis in Italy // Rheumatol. Int. – 2014. – Vol. 34, №5. – P. 659-664.

74 Seoane-Mato D., Sánchez-Piedra C., Silva-Fernández L. et al. Prevalence of rheumatic diseases in adult population in Spain (EPISER 2016 study): Aims and methodology // Reumatol. Clin. – 2019. – Vol. 15, №2. – P. 90-96.

75 Tuncer T., Gilgil E., Kaçar C. et al. Prevalence of Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis in Turkey : A Nationwide Study // Arch Rheumatol. – 2018. – Vol. 33, №2. – P. 128-136.

- 76 Galushko E.A., Nasonov E.L. Prevalence of rheumatic diseases in Russia // *Almanac of Clinical Medicine*. – 2018. – Vol. 46, №1. – P. 32-39.
- 77 Humphreys J.H., Verstappen S.M. et al. The incidence of rheumatoid arthritis in the UK: Comparisons using the 2010 ACR/EULAR classification criteria and the 1987 ACR classification criteria. Results from the Norfolk Arthritis Register // *Ann. Rheum. Dis*. – 2013. – Vol. 72, №8. – P. 1315-1320.
- 78 Widdifield J., Paterson J.M., Bernatsky S. et al. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada // *Arthritis Rheumatol*. – 2014. – Vol. 66, №4. – P. 786-793.
- 79 Hunter T.M., Boytsov N.N., Zhang X. et al. Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004 – 2014 // *Rheumatol. Int. Springer Berlin Heidelberg*. – 2017. – Vol. 37, №9. – P. 1551-1557.
- 80 Slimani S., Ladjouze-Rezig A. Prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Algeria: A prospective study // *Rheumatol*. – 2014. – Vol. 53, №3. – P. 571-573.
- 81 Essouma M., Nkeck J.R., Endomba F.T. et al. Epidemiology of rheumatoid arthritis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis protocol // *Systematic Reviews*. – 2020. – Vol. 9, №1. – P. 81-1-81-9.
- 82 Naqvi A.A., Hassali M.A., Aftab M.T. Epidemiology of rheumatoid arthritis, clinical aspects and socio-economic determinants in Pakistani patients: A systematic review and meta-analysis // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2019. – Vol. 69, №3. – P. 389-398.
- 83 Sung Y.K., Cho S.K., Choi C.B. et al. Prevalence and incidence of rheumatoid arthritis in South Korea // *Rheumatol. Int.* – 2013. – Vol. 33, №6. – P. 1525-1532.
- 84 Silman A.J., Pearson J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis // *Arthritis research & therapy*. – 2002. – Vol. 4, Suppl 3. – P. 265-272.
- 85 Kojima M., Nakayama T., Tsutani K. et al. Epidemiological characteristics of rheumatoid arthritis in Japan: Prevalence estimates using a nationwide population-based questionnaire survey // *Mod. Rheumatol. Taylor & Francis*. – 2020. – Vol. 30, №6. – P. 941-947.
- 86 Pedersen J.K., Svendsen A.J, Hørslev-Petersen K. Incidence of rheumatoid arthritis in the southern part of Denmark from 1995 to 2001. // *Open Rheumatol J.* – 2007. – Vol. 1. – P. 18-23.
- 87 Eriksson J.K., Neovius M., Ernestam S. et al. Incidence of rheumatoid arthritis in Sweden: A Nationwide population-based assessment of incidence, its determinants, and treatment penetration // *Arthritis Care Res.* – 2013. – Vol. 65, №6. – P. 870-878.
- 88 Kovacs W.J., Olsen N.J. Sexual dimorphism of RA manifestations: genes, hormones and behavior // *Nat. Publ. Gr. Nature Publishing Group*. – 2011. – Vol. 7, №5. – P. 307-310.
- 89 Carlsten H. Immune responses and bone loss : the estrogen connection // *Immunol Rev.* – 2005. – Vol. 208. – P. 194-206.

90 Hang X., Zhang Z., Niu R. Estrogen Protects Articular Cartilage by Downregulating ASIC1a in Rheumatoid Arthritis // *J Inflamm Res.* – 2021. – Vol. 12. – P. 843-858.

91 Klareskog L., Padyukov L., Alfredsson L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases // *Curr Opin Rheumatol.* – 2007. – Vol. 19, №1. – P. 49-54.

92 Carlens C., Hergens M.P., Grunewald J. et al. Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 181, №11. – P. 1217-1222.

93 Liao K.P., Alfredsson L. et al. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2009. – Vol. 21, №3. – P. 279-283.

94 Chang K., Yang S.M., Kim S.H. et al. Smoking and Rheumatoid Arthritis // *Int J Mol Sci.* – 2014. – Vol. 15, №12. – P. 22279-22295.

95 Sugiyama D., Nishimura K., Tamaki K. et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies // *Ann Rheum Dis.* – 2010. – Vol. 69, №1. – P. 70-81.

96 Ospelt C., Bang H., Feist E. et al. Carbamylation of vimentin is inducible by smoking and represents an independent autoantigen in rheumatoid arthritis // *Ann Rheum Dis.* – 2017. – Vol. 76, №7. – P. 1176-1183.

97 Hedström A.K., Rönnelid J., Klareskog L. et al. Complex Relationships of Smoking, HLA – DRB1 Genes, and Serologic Profiles in Patients With Early Rheumatoid Arthritis: Update From a Swedish Population- Based Case – Control Study // *Arthritis Rheumatol.* – 2019. – Vol. 71, №9. – P. 1504-1511.

98 Ishikawa Y. et al. The Impact of Cigarette Smoking on Risk of Rheumatoid Arthritis : A Narrative Review // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, №2. – P. 475-1-475-33.

99 Hoovestol R.A., Mikuls T.R.. Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk // *Curr Rheumatol Rep.* – 2011. – Vol. 13, №5. – P. 431-439.

100 Salliot C., Nguyen Y., Boutron-Ruault M.C. et al. Environment and Lifestyle : Their Influence on the Risk of RA // *J Clin Med.* – 2020. – Vol. 9, №10. – P. 3109-1-3109-27.

101 Orellana C., Wedrén S., Källberg H. et al. Parity and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis study // *Ann Rheum Dis.* – 2014. – Vol. 73, №4. – P. 752-755.

102 Wallenius M., Skomsvoll J.F. et al. Postpartum onset of rheumatoid arthritis and other chronic arthritides : results from a patient register linked to a medical birth registry // *Ann Rheum Dis.* – 2010. – Vol. 69, №2. – P. 332-336.

103 Peschken C.A., Robinson D.B. et al. American Native Population Pregnancy and the Risk of Rheumatoid Arthritis in a Highly Predisposed North American Native Population // *J Rheumatol.* – 2012. – Vol. 39, №12. – P. 2253-2260.

104 Guthrie K.A., Dugowson C.E., Voigt L.F. et al. Does Pregnancy Provide Vaccine-like Protection Against Rheumatoid Arthritis ? // *Arthritis Rheum.* – 2010. – Vol. 62, №7. – P. 1842-1848.

105 Ren L., Guo P., Sun Q.M. et al. Number of parity and the risk of rheumatoid arthritis in women: A dose – response meta-analysis of observational

studies // *J Obstet Gynaecol Res.* – 2017. – Vol. 43, №9. – P. 1428-1440.

106 Pikwer M., Bergström U., Nilsson JA. et al. Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis // *Ann Rheum Dis.* – 2009. – Vol. 68, №4. – P. 526-530.

107 Adab P., Jiang C.Q., Rankin E. et al. Original article Breastfeeding practice, oral contraceptive use and risk of rheumatoid arthritis among Chinese women : the Guangzhou Biobank Cohort Study // *Rheumatology (Oxford).* – 2014. – Vol. 53, №5. – P. 860-866.

108 Chen H., Wang J., Zhou W. et al. Metaanalysis Breastfeeding and Risk of Rheumatoid Arthritis : A Systematic Review and Metaanalysis // *J Rheumatol.* – 2015. – Vol. 42, №9. – P. 1563-1569.

109 Orellana C., Saevarsdottir S., Klareskog L. et al. Oral contraceptives, breastfeeding and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study // *Ann Rheum Dis.* – 2017. – Vol. 76, №11. – P. 1845-1852.

110 Qi S., Xin R., Guo W., Liu Y. Meta-analysis of oral contraceptives and rheumatoid arthritis risk in women // *Ther Clin Risk Manag.* – 2014. – Vol. 10. – P. 915-923.

111 Romão V.C., Fonseca J.E. Etiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis : A State-of-the-Art Review // *Front Med (Lausanne).* – 2021. – Vol. 8. – P. 689698-1-689698-54.

112 Gioia C., Lucchino B., Tarsitano M.G. et al. Dietary habits and nutrition in rheumatoid arthritis: Can diet influence disease development and clinical manifestations? // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12, №5. – P. 1456-1-1456-39.

113 Nelson J., Sjöblom H., Gjertsson I. et al. Do interventions with diet or dietary supplements reduce the disease activity score in rheumatoid arthritis? A systematic review of randomized controlled trials // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12, №10. – P. 2991-1-2991-19.

114 Vadell A.K.E., Bärebring L., Hulander E. et al. Anti-inflammatory Diet in Rheumatoid Arthritis (ADIRA) - A randomized, controlled crossover trial indicating effects on disease activity // *Am. J. Clin. Nutr. Oxford University Press.* – 2020. – Vol. 111, №6. – P. 1203-1213.

115 Winkvist A., Bärebring L., Gjertsson I. et al. A randomized controlled cross-over trial investigating the effect of anti-inflammatory diet on disease activity and quality of life in rheumatoid arthritis: The Anti-inflammatory Diet in Rheumatoid Arthritis (ADIRA) study protocol // *Nutr. J. Nutrition Journal.* – 2018. – Vol. 17, №1. – P. 44-1-44-15.

116 Jin Z., Xiang C., Cai Q. et al. Alcohol consumption as a preventive factor for developing rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis of prospective studies // *Ann Rheum Dis.* – 2014. – Vol. 73, №11. – P. 1962-1967.

117 Romeo J., Wärnberg J., Nova E. et al. Moderate alcohol consumption and the immune system : A review // *Br J Nutr.* – 2007. – Vol. 98, №1. – P. 111-115.

118 Scott I.C., Tan R., Stahl D. et al. The protective effect of alcohol on developing rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis // *Rheumatology (Oxford).* – 2013. – Vol. 52, №5. – P. 856-867.

- 119 Bae S.C., Lee Y.H. Alcohol intake and risk of rheumatoid arthritis: a Mendelian randomization study // *Z Rheumatol.* – 2019. – Vol. 78, №8. – P. 791-796.
- 120 Hu Y., Costenbader K.H., Gao X et al. Sugar-sweetened soda consumption and risk of developing rheumatoid arthritis in women // *Am J Clin Nutr.* – 2014. – Vol. 100, №3. – P. 959-967.
- 121 Lee Y.H., Bae S.C., Song G.G. Coffee or tea consumption and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis // *Clin Rheumatol.* – 2014. – Vol. 33, №11. – P. 1575-1583.
- 122 Forsyth C., Kouvari M., D'Cunha N.M. et al. The effects of the Mediterranean diet on rheumatoid arthritis prevention and treatment: a systematic review of human prospective studies // *Rheumatol. Int.* Springer Berlin Heidelberg. – 2018. – Vol. 38, №5. – P. 737-747.
- 123 Matsumoto Y., Sugioka Y., Tada M. et al. Monounsaturated fatty acids might be key factors in the Mediterranean diet that suppress rheumatoid arthritis disease activity: The TOMORROW study // *Clin. Nutr.* Elsevier Ltd. – 2018. – Vol. 37, №2. – P. 675-680.
- 124 Di Giuseppe D., Crippa A., Orsini N. et al. Fish consumption and risk of rheumatoid arthritis : a dose-response meta-analysis // *Arthritis Res Ther.* – 2014. – Vol. 16, №5. – P. 446-1-446-9.
- 125 Hu Y., Costenbader K.H., Gao X. et al. Mediterranean Diet and Incidence of Rheumatoid Arthritis in Women // *Arthritis Care Res (Hoboken).* – 2015. – Vol. 67, №5. – P. 597-606.
- 126 Porrás M., Rada G., Durán J. Effects of Mediterranean diet on the treatment of rheumatoid arthritis // *Medwave.* – 2019. – Vol. 19, №5. – P. e7640.
- 127 Ball R.J., Avenell A., Aucott L. et al. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis // *Arthritis Res. Ther. Arthritis Research & Therapy.* – 2015. – Vol. 29, №17. – P. 274-1-274-14.
- 128 Ebringer A., Rashid T., Wilson C. Autoimmunity Reviews Rheumatoid arthritis, Proteus, anti-CCP antibodies and Karl Popper // *Autoimmun. Rev.* – 2010. – Vol. 9, №4. – P. 216-223.
- 129 Mathew A.J., Ravindran V. Infections and arthritis // *Best Pract Res Clin Rheumatol.* – 2014. – Vol. 28, №6. – P. 935-599.
- 130 Youssefi M., Tafaghodi M., Farsiani H. et al. ScienceDirect Helicobacter pylori infection and autoimmune diseases; Is there an association with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, autoimmune atrophy gastritis and autoimmune pancreatitis? A systematic review and meta-analysis study // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2021. – Vol. 54, №3. – P. 359-369.
- 131 Lee Y.H., Bae S.C. Vitamin D level in rheumatoid arthritis and its correlation with the disease activity: a meta-analysis // *Clin Exp Rheumatol.* – 2016. – Vol. 34, №5. – P. 827-833.
- 132 Harrison S.R., Li D., Jeffery L.E. et al. Vitamin D, Autoimmune Disease and Rheumatoid Arthritis // *Calcif Tissue Int.* – 2020. – Vol. 106, №1. – P. 58-75.
- 133 Pedersen M., Jacobsen S., Klarlund M., Frisch M. Socioeconomic status

and risk of rheumatoid arthritis: a Danish case-control study // *J Rheumatol.* – 2006. – Vol. 33, №6. – P. 1069-1074.

134 Izadi Z., Li J., Evans M., Hammam N. et al. Socioeconomic Disparities in Functional Status in a National Sample of Patients With Rheumatoid Arthritis // *JAMA Netw Open.* – 2021. – Vol. 4, №8. – P. e2119400-1-e2119400-17.

135 Khurana R., Berney S.M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis // *Pathophysiology.* – 2005. – Vol. 12, №3. – P. 153-165.

136 Issilbayeva A.A., Meiramova A.M., Kushugulova A.R. et al. The Clinical Course of Rheumatoid Arthritis in Kazakhstani Patients // *OAMJMS.* – 2021. – Vol. 9. – P. 1352-1358.

137 Aletaha D., Neogi T., Silman A.J. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative // *Arthritis & Rheumatism.* – 2010. – Vol. 62, №9. – P. 2569-2581.

138 Finckh A., Turesson C. The impact of obesity on the development and progression of rheumatoid arthritis // *Ann Rheum Dis.* – 2014. – Vol. 73, №11. – P. 1911-1914.

139 Alvarez-nemegyei J., Buenfil-relo F.A. et al. Asociación entre composición corporal y actividad inflamatoria en artritis reumatoide. Una revisión sistemática // *Reumatol. Clínica. SEGO.* – 2015. – Vol. 12, №4. – P. 190-195.

140 Alvarez-Nemegyei J., Pacheco-Pantoja E., González-Salazar M. et al. Association between Overweight/Obesity and Clinical Activity in Rheumatoid Arthritis // *Reumatol Clin (Engl Ed).* – 2020. – Vol. 16, №6. – P. 462-467.

141 Delft M.A.M. Van, Huizinga T.W.J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis // *J. Autoimmun. Elsevier.* – 2019. – Vol. 110. – P. 102392.

142 Salma K., Nessrine A., Krystal E. et al. Rheumatoid Arthritis: Seropositivity versus Seronegativity; A Comparative Cross-sectional Study Arising from Moroccan Context // *Curr Rheumatol Rev.* – 2020. – Vol. 16, №2. – P. 143-148.

143 Gadeholt O., Hausotter K., Eberle H. et al. Differing X-ray patterns in seronegative and seropositive rheumatoid arthritis // *Clin Rheumatol.* – 2019. – Vol. 38, №9. – P. 2403-2410.

144 Koga T., Okada A., Fukuda T. et al. Anti-citrullinated peptide antibodies are the strongest predictor of clinically relevant radiographic progression in rheumatoid arthritis patients achieving remission or low disease activity : A post hoc analysis of a nationwide cohort in Japan // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, №5. – P. e0175281-1-e0175281-14.

145 Grosse J., Allado E., Roux C. et al. ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis: two distinct erosive disease entities on radiography and ultrasonography // *Rheumatol Int.* – 2020. – Vol. 40, №4. – P. 615-624.

146 Boeters D.M., Burgers L.E., Sasso E.H. et al. ACPA-negative RA consists of subgroups: patients with high likelihood of achieving sustained DMARD-free remission can be identified by serological markers at disease presentation // *Arthritis Research & Therapy.* – 2019. – Vol. 21, №1. – P. 121-1-121-17.

147 Böhler C., Radner H., Smolen J.S., Aletaha D. Serological changes in the

course of traditional and biological disease modifying therapy of rheumatoid arthritis // *Ann Rheum Dis.* – 2013. – Vol. 72, №2. – P. 241-244.

148 Hensvold A.H., Frisell T., Magnusson P.K. et al. How well do ACPA discriminate and predict RA in the general population: A study based on 12 590 population-representative Swedish twins // *Ann. Rheum. Dis.* BMJ Publishing Group. – 2017. – Vol. 76, №1. – P. 119-125.

149 Umeda N., Matsumoto I., Sumida T. The pathogenic role of ACPA in rheumatoid arthritis // *J. Clin. Immunol.* – 2017. – Vol. 40, №6. – P. 391-395.

150 Degboé Y. Pre-rheumatoid arthritis and ACPA: Contribution of ACPAs in the pathogeny of pre-disease stage // *Jt. Bone Spine. Société française de rhumatologie.* – 2021. – Vol. 88, №3. – P. 105098-105105.

151 Oka S., Higuchi T. et al. Serum rheumatoid factor IgA, anti-citrullinated peptide antibodies with secretory components, and anti-carbamylated protein antibodies associate with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis // *BMC Musculoskelet. Disord. BioMed Central.* – 2022. – Vol. 23, №1. – P. 46-1-46-13.

152 Tilstra J.S., Lienesch D.W. Rheumatoid Nodules // *Dermatol. Clin.* Elsevier Inc. – 2015. – Vol. 33, №3. – P. 361-371.

153 Voigt T.P., Bause L. et al. Rheumatoid arthritis: These dermatoses lead you to the diagnosis // *Hautarzt.* – 2021. – Vol. 72, №11. – P. 935-944.

154 Conforti A., Di Cola I., Pavlych V. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis // *Autoimmun. Rev. Elsevier B.V.* – 2020. – Vol. 20, №2. – P. 102735.

155 Nyhäll-Wählin B.M., Turesson C., Jacobsson L.T. et al. The presence of rheumatoid nodules at early rheumatoid arthritis diagnosis is a sign of extra-articular disease and predicts radiographic progression of joint destruction over 5 years // *Scand J Rheumatol.* – 2011. – Vol. 40, №2. – P. 81-87.

156 Cojocaru M., Cojocaru I.M., Chicoş B. New insight into the rheumatoid vasculitis // *Rom J Intern Med.* – 2015. – Vol. 53, №2. – P. 128-132.

157 Chua-Aguilera C.J., Möller B., Yawalkar N. Skin Manifestations of Rheumatoid Arthritis, Juvenile Idiopathic Arthritis, and Spondyloarthritides // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2017. – Vol. 53, №3. – P. 371-393.

158 Young S. Ocular involvement in connective tissue disorders // *Curr Allergy Asthma Rep.* – 2005. – Vol. 5, №4. – P. 323-326.

159 Snyder M.J., Bepko J., White M. Acute pericarditis: diagnosis and management // *Am Fam Physician.* – 2014. – Vol. 89, №7. – P. 553-560.

160 Kadura S., Raghu G. Rheumatoid arthritis-interstitial lung disease: manifestations and current concepts in pathogenesis and management // *Eur Respir Rev.* – 2021. – Vol. 30, №160. – P. 210011-1-210011-18.

161 Scott D.L., Wolfe F., Huizinga T.W.J. Rheumatoid arthritis // *Lancet (London, England).* – 2010. – Vol. 376, №9746. – P. 1094-1108.

162 Alani H., Henty J.R., Thompson N.L. et al. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of polyautoimmunity in Sjögren's syndrome (secondary Sjögren's syndrome) focusing on autoimmune rheumatic diseases Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of polyautoimmunity in //

- Scand. J. Rheumatol. Taylor & Francis. – 2017. – Vol. 47, №2. – P. 141-154.
- 163 Kim H., Cho S.K., Kim H.W. et al. The Prevalence of Sjögren ' s Syndrome in Rheumatoid Arthritis Patients and Their Clinical Features // J Korean Med Sci. – 2020. – Vol. 35, №45. – P. e369-1-e369-11.
- 164 Maiuolo J., Muscoli C., Gliozzi M. et al. Endothelial Dysfunction and Extra-Articular Neurological Manifestations in Rheumatoid Arthritis // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11, №1. – P. 81-1-84-34.
- 165 Dequattro K. Neurologic Manifestations of Rheumatoid Arthritis // Reumatologia. – 2017. – Vol. 58, №2. – P. 116-122.
- 166 Craddock N., Hurles M.E., Cardin N. et al. Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls // Nature. – 2010. – Vol. 464, №7289. – P. 713-720.
- 167 Hayashi S., Matsubara T., Fukuda K. et al. A genome-wide association study identifying the SNPs predictive of rapid joint destruction in patients with rheumatoid arthritis // Biomed Rep. – 2021. – Vol. 14, №3. – P. 31-1-31-11.
- 168 Umičević Mirkov M., Cui J., Vermeulen S.H. et al. Genome-wide association analysis of anti-TNF drug response in patients with rheumatoid arthritis // Ann Rheum Dis. – 2013. – Vol. 72, №8. – P. 1375-1381.
- 169 Freudenberg J., Lee H.S., Han B.G. et al. Genome-Wide Association Study of Rheumatoid Arthritis in Koreans Population-Specific Loci as Well as Overlap With European Susceptibility Loci // Arthritis Rheum. – 2011. – Vol. 63, №4. – P. 884-893.
- 170 Plant D., Bowes J., Potter C. et al. Genome-wide association study of genetic predictors of anti-tumor necrosis factor treatment efficacy in rheumatoid arthritis identifies associations with polymorphisms at seven loci // Arthritis Rheum. – 2011. – Vol. 63, №3. – P. 645-653.
- 171 Traylor M., Knevel R. et al. Genetic associations with radiological damage in rheumatoid arthritis: Meta-analysis of seven genome-wide association studies of 2,775 cases // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, №10. – P. e0223246-1-e0223246-15.
- 172 Ohmura K. GWAS of Rheumatoid Arthritis and Drug Discovery // Rinsho Byori. – 2015. – Vol. 63, №4. – P. 485-490.
- 173 Karami J., Aslani S., Jamshidi A. et al. Genetic implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis ; an updated review // Gene. Elsevier. – 2019. – Vol. 702, №3. – P. 8-16.
- 174 du Montcel S.T., Michou L., Petit-Teixeira E. et al. New Classification of HLA – DRB1 Alleles Supports the Shared Epitope Hypothesis of Rheumatoid Arthritis Susceptibility // Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52, №4. – P. 1063-1068.
- 175 Kampstra A.S.B., Toes R.E.M. HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation // Immunogenetics. – 2017. – Vol. 69, №8-9. – P. 597-603.
- 176 Okada Y., Kim K., Han B. et al. Risk for ACPA-positive rheumatoid arthritis is driven by shared HLA amino acid polymorphisms in Asian and European populations // Hum. Mol. Genet. – 2014. – Vol. 23, №25. – P. 6916-6926.
- 177 van der Helm-van Mil A.H., Huizinga T.W. et al. An Independent Role of Protective HLA Class II Alleles in Rheumatoid Arthritis Severity and Susceptibility //

Arthritis Rheum. – 2005. – Vol. 52, №9. – P. 2637-2644.

178 Kallberg .H, Padyukov L., Plenge R.M. et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-B*RB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis // Am. J. Hum. Genet. Cell Press. – 2007. – Vol. 80, №5. – P. 867-875.

179 Frisell T., Saevarsdottir S., Askling J. Does a family history of RA influence the clinical presentation and treatment response in RA? // Ann Rheum Dis. – 2016. – Vol. 75, №6. – P. 1120-1125.

180 rs9268839 // <https://www.snpedia.com>. 15.02.2020.

181 Mustelin T., Bottini N., Stanford S.M. The Contribution of PTPN22 to Rheumatic Disease // Arthritis Rheumatol. – 2019. – Vol. 71, №4. – P. 486-495.

182 Nabi G., Akhter N., Wahid M. et al. Meta-analysis reveals PTPN22 1858C/T polymorphism confers susceptibility to rheumatoid arthritis in Caucasian but not in Asian population // Autoimmunity. – 2016. – Vol. 49, №3. – P. 197-210.

183 Abbasifard M., Imani D., Bagheri-Hosseini Z. PTPN22 gene polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis (RA): Updated systematic review and meta-analysis // J Gene Med. – 2020. – Vol. 22, №9. – P. e3204.

184 Newman W.G., Zhang Q., Liu X. et al. Rheumatoid Arthritis Association With the FCRL3 – 169C Polymorphism Is Restricted to PTPN22 1858T – Homozygous Individuals in a Canadian Population // Arthritis Rheum. – 2006. – Vol. 54, №12. – P. 3820-3827.

185 Thompson S.D., Sudman M., Ramos P.S. et al. The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN22, COG6, and ANGPT1 // Arthritis Rheum. – 2010. – Vol. 62, №11. – P. 3265-3276.

186 Chang X., Xia Y., Pan J. et al. PADI2 Is Significantly Associated with Rheumatoid Arthritis // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, №12. – P. e81259-1- e81259-14.

187 Wang Y., Wysocka J., Sayegh J. et al. Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylation // Science. – 2004. – Vol. 306, №5694. – P. 279-283.

188 Arita K., Shimizu T., Hashimoto H. et al. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4 // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – Vol. 103, №14. – P. 5291-5296.

189 Lu C, .Xu K. et al. The relationship of PADI4_94 polymorphisms with the morbidity of rheumatoid arthritis in Caucasian and Asian populations: a meta-analysis and system review // Clin Rheumatol. – 2018. – Vol. 37, №2. – P. 289-296.

190 Yang X.K., Liu J., Liang Y. et al. Associations Between PADI4 Gene Polymorphisms and Rheumatoid Arthritis: An Updated Meta-analysis // Arch. Med. Res. Elsevier Inc. – 2015. – Vol. 46, №4. – P. 317-325.

191 Hua J., Huang W. Peptidylarginine deiminase 4 -104C/T polymorphism and risk of rheumatoid arthritis: A pooled analysis based on different populations // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, №3. – P. e0193674-1- e0193674-9.

192 Plenge R.M., Padyukov L., Remmers E.F. et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: Association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and

PADI4 // *Am. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 77, №6. – P. 1044-1060.

193 Cheng J., Zhang H., Zhuang C. et al. Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Methyl-CpG Binding Domain 4 Polymorphisms in Chinese Patients with Rheumatoid Arthritis // *J Rheumatol.* – 2012. – Vol. 39, №6. – P. 1159-1165.

194 Chen R., Wei Y., Cai Q. et al. The PADI4 gene does not contribute to genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Chinese Han population // *Rheumatol Int.* – 2011. – Vol. 31, №12. – P. 1631-1634.

195 Mergaert A.M., Bawadekar M., Nguyen T.Q. et al. Reduced Anti-Histone Antibodies and Increased Risk of Rheumatoid Arthritis Associated with a Single Nucleotide Polymorphism in PADI4 in North Americans // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, №12. – P. 3093-1-3093-17.

196 Burr M.L., Naseem H., Hinks A. et al. PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population // *Ann. Rheum. Dis.* – 2010. – Vol. 69, №4. – P. 666-670.

197 Gandjbakhch F., Fajardy I., Ferré B. et al. A Functional Haplotype of PADI4 Gene in Rheumatoid Arthritis : Positive Correlation in a French Population // *Rheumatol.* – 2009. – Vol. 36, №5. – P. 881-886.

198 Martinez A., Valdivia A., Pascual-Salcedo D. et al. PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population // *Rheumatology.* – 2005. – Vol. 44, №10. – P. 1263-1266.

199 Le Coz C., Nolan B.E., Trofa M. et al. Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 Haploinsufficiency- Associated Inflammation Can Occur Independently of T-Cell Hyperproliferation // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 24, №9. – P. 1715-1-1715-12.

200 Walker E.J., Hirschfield G.M., Xu C. et al. CTLA4/ICOS Gene Variants and Haplotypes Are Associated With Rheumatoid Arthritis and Primary Biliary Cirrhosis in the Canadian Population // *Arthritis Rheum.* – 2009. – Vol. 60, №4. – P. 931-937.

201 Aslam M.M., Jalil F., John P. et al. A sequencing study of CTLA4 in Pakistani rheumatoid arthritis cases // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, №9. – P. e0239426-1-e0239426-11.

202 Zhou C., Gao S., Yuan X. et al. Association between CTLA-4 gene polymorphism and risk of rheumatoid arthritis : a meta-analysis // *Aging (Albany NY).* – 2021. – Vol. 13, №15. – P. 19397-19414.

203 Linterman M.A., Denton A.E., Divekar D.P. et al. CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection // *Elife.* – 2014. – Vol. 27, №3. – P. e03180-1- e03180-28.

204 Luterek-Puszyńska K., Malinowski D., Paradowska-Gorycka A. et al. CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis // *Clin Rheumatol.* – 2017. – Vol. 36, №5. – P. 1129-1135.

205 Kawabe T., Matsushima M., Hashimoto N. et al. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity // *Nagoya J Med Sci.* – 2011. – Vol. 73, №3-4. – P. 69-78.

206 Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C. et al. Molecular mechanism and

function of CD40/CD40L engagement in the immune system // *Immunol Rev.* – 2013. – Vol. 229, №1. – P. 1-31.

207 Zamanpoor M. The genetic pathogenesis , diagnosis and therapeutic insight of rheumatoid arthritis// *Clin Genet.* –2019. – Vol. 95, №5. – P. 547-557.

20 Román-Fernández I.V., García-Chagollán M., Cerpa-Cruz S. et al. Assessment of CD40 and CD40L expression in rheumatoid arthritis patients , association with clinical features and DAS28// *Clin Exp Med.* – 2019. – Vol. 19, №4. – P. 427-437.

209 Liao J., Liang G., Xie S. et al. CD40L demethylation in CD4 + T cells from women with rheumatoid arthritis // *Clin Immunol.* – 2012. – Vol. 145, №1. – P. 13-18.

210 Nishikomori R., Usui T., Wu C.Y. et al. Activated STAT4 Has an Essential Role in Th1 Differentiation and Proliferation That Is Independent of Its Role in the Maintenance of IL-12R β 2 Chain Expression and Signaling // *J Immunol.* – 2002. – Vol. 169, №8. – P. 4388-4398.

211 Lee Y.H., Woo J.H., Choi S.J. et al. Association between the rs7574865 polymorphism of STAT4 and rheumatoid arthritis : a meta-analysis // *Rheumatol Int.* – 2010. – Vol. 30, №5. – P. 661-666.

212 Tong G., Zhang X., Tong W. et al. Association between polymorphism in STAT4 gene and risk of rheumatoid arthritis : A meta-analysis // *Hum. Immunol.* – 2013. – Vol. 74, №5. – P. 586-592.

213 Elshazli R., Settin A. Immunobiology Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis : A meta-analysis update // *Immunobiology. Elsevier GmbH.* – 2015. – Vol. 220, №8. – P. 1012-1024.

214 Jiang X., Zhou Z., Zhang Y. et al. An updated meta-analysis of the signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4) rs7574865 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis risk in an Asian population // *Scand J Rheumatol.* – 2014. – Vol. 43, №6. – P. 477-480.

215 Arshad M., Bhatti A., John P. et al. Cytokine T cell activation Rho GTPase activating protein (TAGAP) is upregulated in clinical and experimental arthritis // *Cytokine. Elsevier.* – 2017. – Vol. 104. – P. 130-135.

216 Chatzikyriakidou A., Voulgari P.V., Lambropoulos A. et al. Validation of the TAGAP rs212389 polymorphism in rheumatoid arthritis susceptibility // *Joint Bone Spine.* – 2013. – Vol. 80, №5. – P. 543-544.

217 Castro-Santos P., Verdugo R.A., Alonso-Arias R. et al. Association analysis in a Latin American population revealed ethnic differences in rheumatoid arthritis-associated SNPs in Caucasian and Asian populations // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, №1. – P. 7879-1-7879-11.

218 Perkins E.A., Landis D. et al. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in CCR6, TAGAP, and TNFAIP3 With Rheumatoid Arthritis in African Americans // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64, №5. – P. 1355-1358.

219 Kudlyk T., Willett R., Pokrovskaya I.D. et al. COG6 Interacts with a Subset of the Golgi SNAREs and Is Important for the Golgi Complex Integrity // *Traffic.* – 2013. – Vol. 14, №2. – P. 194-204.

220 Márquez A., Vidal-Bralo L., Rodríguez-Rodríguez L. et al. A combined large-scale meta-analysis identifies COG6 as a novel shared risk locus for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus // *Ann Rheum Dis*, - 2017. - Vol. 76, № 1. - P. 286-294.

221 Liu Y., Helms C., Liao W. et al. A genome-wide association study of psoriasis and psoriatic arthritis identifies new disease loci. // *PLoS Genet*. - 2008. - Vol. 4, №3. - P. e1000041-1- e100004-24.

222 Thompson S.D., Sudman M., Ramos P.S. et al. The susceptibility loci juvenile idiopathic arthritis shares with other autoimmune diseases extend to PTPN2, COG6, and ANGPT1 // *Arthritis Rheum*. - 2010. - Vol. 62, №11. - P. 3265-3276.

223 Edilova M.I., Abdul-Sater A.A., Watts T.H. TRAF1 Signaling in Human Health and Disease // *Front Immunol*. - 2018. - Vol. 18, №9. - P. 2969-1-2969-24.

224 Viatte S., Plant D., Lunt M. et al. Investigation of rheumatoid arthritis genetic susceptibility markers in the early rheumatoid arthritis study further replicates the TRAF1 association with radiological damage // *J Rheumatol*. - 2013. - Vol. 40, №2. - P. 144-156.

225 Plenge R.M., Seielstad M., Padyukov L. et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study // *N Engl J Med*. - 2007. - Vol. 357, №12. - P. 1199-1209.

226 Knevel R., de Rooy D.P., Gregersen P.K. et al. Studying associations between variants in TRAF1-C5 and TNFAIP3- OLIG3 and the progression of joint destruction in rheumatoid arthritis in multiple cohorts // *Ann Rheum Dis*. - 2012. - Vol. 71, №10. - P. 1753-1755.

227 Mohamed R.H., Pasha H.F., El-shahawy E.E. Influence of TRAF1 / C5 and STAT4 genes polymorphisms on susceptibility and severity of rheumatoid arthritis in Egyptian population // *Cell. Immunol. Elsevier Inc*. - 2012. - Vol. 273, №1. - P. 67-72.

228 Janz R., Südhof T.C., Hammer R.E. et al. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I // *Neuron*. - 1999. - Vol. 24, №3. - P. 687-700.

229 Belizaire R., Komanduri C., Wooten K. et al. Characterization of synaptogyrin 3 as a new synaptic vesicle protein // *J Comp Neurol*. - 2004. - Vol.470, №3. - P. 266-281.

230 Iatropoulos P., Gardella R., Valsecchi P. et al. Association study and mutational screening of SYNGR1 as a candidate susceptibility gene for schizophrenia // *Psychiatr Genet*. - 2009. - Vol. 19, №5. - P. 237-243.

231 Sun C., Molineros J.E., Looger L.L. et al. High-density genotyping of immune-related loci identifies new SLE risk variants in individuals with Asian ancestry // *Nat. Genet*. - 2016. - Vol. 48, №3. - P. 323-330.

232 Liu D., Liu J., Cui G. et al. Evaluation of the association of UBASH3A and SYNGR1 with rheumatoid arthritis and disease activity and severity in Han Chinese // *Oncotarget*. - 2017. - Vol. 8, №61. - P. 103385-103392.

233 Cavalli M., Pan G., Nord H. et al. Allele-specific transcription factor binding to common and rare variants associated with disease and gene expression //

- Hum. Genet. Springer Berlin Heidelberg. – 2016. – Vol. 135, №5. – P. 485-497.
- 234 Somekh I., Marquardt B., Liu Y. et al. Novel Mutations in RASGRP1 are Associated with Immunodeficiency, Immune Dysregulation, and EBV-Induced Lymphoma // *J Clin Immunol.* – 2018. – Vol. 38, №6. – P. 699-710.
- 235 Ruiz-Larrañaga O., Uribarri M., Alcaro M.C. et al. Genetic variants associated with rheumatoid arthritis patients and serotypes in European populations. // *Clin Exp Rheumatol.* – 2016. – Vol. 34, №2. – P. 236-241.
- 236 Golinski M.L., Vandhuick T., Derambure C. et al. Dysregulation of RasGRP1 in rheumatoid arthritis and modulation of RasGRP3 as a biomarker of TNF α inhibitors // *Arthritis Res Ther.* – 2015. – Vol. 17. – P. 382-21-382-21.
- 237 Dittmer J. The Biology of the Ets1 Proto-Oncogene // *Mol Cancer.* – 2003. – Vol. 2. – P. 29-1-29-36.
- 238 Zhang Y., Bo L., Zhang H. et al. WDFY Family Member 4 (WDFY4) Polymorphisms in Chinese Patients with Rheumatoid Arthritis // *Int J Mol Sci.* – 2014. – Vol. 15, №2. – P. 2712-2721.
- 239 Chen L., Huang Z., Yang B. et al. Association of E26 Transformation Specific Sequence 1 Variants with Rheumatoid Arthritis in Chinese Han Population // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, №8. – P. e0134875-1-e0134875-13.
- 240 Nagata S., Ise T., Pastan I. Fc receptor-like 3 protein expressed on IL-2 nonresponsive subset of human regulatory T cells // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182, №12. – P. 7518-7526.
- 241 Ramírez-Bello J., Jiménez-Morales S., Espinosa-Rosales F. et al. Juvenile rheumatoid arthritis and asthma, but not childhood-onset systemic lupus erythematosus are associated with FCRL3 polymorphisms in Mexicans // *Mol. Immunol.* Elsevier Ltd. – 2013. – Vol. 53, №4. – P. 374-378.
- 242 Lin X., Zhang Y., Chen Q. FCRL3 gene polymorphisms as risk factors for rheumatoid arthritis // *Hum. Immunol.* – 2016. – Vol. 77, №2. – P. 223-229.
- 243 Sun Q., Hua D., Zhou J. et al. LBH mRNA Expression and Polymorphisms in Patients with Rheumatoid Arthritis. // *Clin Lab.* – 2018. – Vol. 64, №11. – P. 30549979.
- 244 Ekwall A.K., Whitaker J.W., Hammaker D. et al. The Rheumatoid Arthritis Risk Gene LBH Regulates Growth in Fibroblast-like Synoviocytes // *Arthritis Rheumatol.* – 2015. – Vol. 67, №5. – P. 1193-1202.
- 245 Kurkó J., Besenyei T., Laki J. et al. Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2013. – Vol. 45, №2. – P. 170-179.
- 246 Negi S., Juyal G., Senapati S. et al. A Genome-Wide Association Study Reveals ARL15 , a Novel Non-HLA Susceptibility Gene for Rheumatoid Arthritis in North Indians // *Arthritis Rheum.* – 2013. – Vol. 65, №12. – P. 3026-3035.
- 247 Danila M.I., Laufer V.A., Reynolds R.J. et al. Dense Genotyping of Immune-Related Regions Identifies Loci for Rheumatoid Arthritis Risk and Damage in African Americans // *Mol Med.* – 2017. – Vol. 23. – P. 177-187.
- 248 Zhu H., Xia W., Mo X.B. et al. Gene-Based Genome-Wide Association Analysis in European and Asian Populations Identified Novel Genes for Rheumatoid

- Arthritis // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, №11. – P. e0167212-1- e0167212-16.
- 249 Laufer V.A., Tiwari H.K., Reynolds R.J. et al. Genetic influences on susceptibility to rheumatoid arthritis in African-Americans // Hum Mol Genet. – 2018. – Vol. 28, №5. – P. 858-874.
- 250 Leng R.X., Di D.S., Ni J. et al. Identification of new susceptibility loci associated with rheumatoid arthritis // Ann Rheum Dis. – 2020. – Vol. 79, №12. – P. 1565-1571.
- 251 Issilbayeva A.A., Aunabekova B.A. Genetic associations with rheumatoid arthritis susceptibility. Review // Nauka i Zdravookhranenie. – 2022. – Vol. 24, №1. – P. 139-146.
- 252 Thursby E., Juge N. Introduction to the human gut microbiota // Biochem. J. – 2017. – Vol. 474, №11. – P. 1823-1836.
- 253 Barko P.C., McMichael M.A., Swanson K.S. et al. The Gastrointestinal Microbiome: A Review // J. Vet. Intern. Med. – 2018. – Vol. 32, №1. – P. 9-25.
- 254 Юдина Ю.В., Корсунский А.А., Аминова А.И. и др. Микробиота кишечника как отдельная система организма // Доказательная гастроэнтерология. – 2019. – №8(4-5). – С. 36-43.
- 255 Исильбаева А. Современные аспекты изучения микробиоценоза полости рта в развитии ревматоидного артрита // Валеология: Здоровье, Болезнь, Выздоровление. – 2019. – Т. 8, №7172. – С. 23-27.
- 256 Chu X.J., Cao N.W., Zhou H.Y. et al. The oral and gut microbiome in rheumatoid arthritis patients: A systematic review // Rheumatol. – 2021. – Vol. 60, №3. – P. 1054-1066.
- 257 Corfield A.P. The interaction of the gut microbiota with the mucus barrier in health and disease in human // Microorganisms. – 2018. – Vol. 6, №3. – P. 18-26.
- 258 Scher J.U., Sczesnak A., Longman R.S. et al. Expansion of intestinal Prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis // Elife. – 2013. – Vol. 2. – P. e01202-1- e01202-33.
- 259 Viladomiu M., Kivoolowitz C. et al. IgA-coated E. coli enriched in Crohn's disease spondyloarthritis promote TH 17-dependent inflammation // Sci Transl Med. – 2017. – Vol. 9, №376. – P. eaaf9655-1- eaaf9655-24.
- 260 Wu H.J., Ivanov I.I., Darce J. et al. Article Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells // Immunity. Elsevier Ltd. – 2010. – Vol. 32, №6. – P. 815-827.
- 261 Forbes J.D., Chen C.Y., Knox N.C. et al. A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases - Does a common dysbiosis exist? // Microbiome. – 2018. – Vol. 6, №1. – P. 221-1-221-26.
- 262 Zaiss M.M., Joyce Wu H.J., Mauro D. et al. The gut-joint axis in rheumatoid arthritis // Nat. Rev. Rheumatol. Springer US. – 2021. – Vol. 17, №4. – P. 224-237.
- 263 Bergot A.S., Giri R., Thomas R. The microbiome and rheumatoid arthritis // Best Pract Res Clin Rheumatol. – 2019. – Vol. 33, №6. – P. 101497.
- 264 Balakrishnan B., Luckey D., Taneja V. Autoimmunity-Associated Gut Commensals Modulate Gut Permeability and Immunity in Humanized Mice // Mil

Med. – 2019. – Vol. 184. – P. 529-536.

265 Scher J.U., Ubeda C., Equinda M. et al. Periodontal disease and the oral microbiota in new-onset rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64, №10. – P. 3083-3094.

266 Hitchon C.A., Chandad F., Ferucci E.D. et al. Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Are Associated with Anticitrullinated Protein Antibodies in Patients with Rheumatoid Arthritis and Their Relatives // *J. Rheumatol.* – 2010. – Vol. 37, №6. – P. 1105-1112.

267 Scher J.U., Ubeda C., Equinda M. et al. Periodontal Disease and the Oral Microbiota in New-Onset Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheum.* – 2012. – Vol. 64, №10. – P. 3083-3094.

268 Marietta E.V., Murray J.A., Luckey D.H. et al. Human Gut-Derived *Prevotella histicola* Suppresses Inflammatory Arthritis in Humanized Mice // *Arthritis Rheumatol.* – 2016. – Vol. 68, №1. – P. 2878-2888.

269 Vaahтовuo J., Munukka E., Korkeamäki M. et al. Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. // *J. Rheumatol.* – 2008. – Vol. 35, №8. – P. 1500-1505.

270 Pianta A., Arvikar S., Strle K. et al. Evidence for Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients with Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheumatol.* – 2017. – Vol. 69, №5. – P. 964-975.

271 Lopez-Oliva I., Paropkari A.D., Saraswat S. Dysbiotic Subgingival Microbial Communities in Periodontally Healthy Patients With Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheumatol.* – 2018. – Vol. 70, №7. – P. 1008-1013.

272 Looh S.C., Soo Z.M.P., Wong J.J. et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as the Aetiological Cause of Rheumatoid Arthritis: What Are the Unsolved Puzzles? // *Toxins (Basel).* – 2022. – Vol. 14, №1. – P. 50-1-50-35.

273 Seksik P., Rigottier-Gois L., Gramet G. et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon // *Gut.* – 2003. – Vol. 52, №2. – P. 237-242.

274 Abdollahi-Roodsaz S., Joosten L.A., Koenders M.I. et al. Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis // *J Clin Invest.* – 2008. – Vol. 118, №1. – P. 205-216.

275 Liu X., Zou Q., Zeng B. et al. Analysis of Fecal *Lactobacillus* Community Structure in Patients with Early Rheumatoid Arthritis // *Curr Microbiol.* – 2013. – Vol. 67, №2. – P. 170-176.

276 Sun Y., Chen Q., Lin P. et al. Characteristics of Gut Microbiota in Patients With Rheumatoid Arthritis in Shanghai, China // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 369-1-369-18.

277 Wells P.M., Adebayo A.S., Bowyer R.C.E. et al. Associations between gut microbiota and genetic risk for rheumatoid arthritis in the absence of disease : a cross-sectional study // *Lancet Rheumatol.* – 2020. – Vol. 2, №7. – P. e418-e427.

278 Kitamura K., Sasaki M., Matsumoto M. et al. Protective effect of *Bacteroides fragilis* LPS on *Escherichia coli* LPS-induced inflammatory changes in human monocytic cells and in a rheumatoid arthritis mouse model // *Immunol. Lett. Elsevier B.V.* – 2021. – Vol. 233. – P. 48-56.

- 279 Zafar H., Saier M.H. Jr. Gut Bacteroides species in health and disease // Gut Microbes. – 2021. – Vol. 13, №1. – P. 1848158-1-1848158-35.
- 280 Wexler A.G. et al. An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome // Nat Microbiol. – 2017. – Vol. 2. – P. 17026-1-17026-27.
- 281 Rodrigues G.S.P., Cayres L.C.F., Gonçalves F.P. et al. Detection of Increased Relative Expression Units of Bacteroides and Decreased Clostridium leptum in Stool Samples from Brazilian Rheumatoid Arthritis Patients : A Pilot Study // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7, №10. – P. 413-1-413-16.
- 282 Alpizar-Rodriguez D., Lesker T.R., Gronow A. et al. Prevotella copri in individuals at risk for rheumatoid arthritis // Ann Rheum Dis. – 2019. – Vol. 78, №5. – P. 590-593.
- 283 Chen J., Wright K., Davis J.M. et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis // Genome Med. – 2016. – Vol. 8, №1. – P. 43-1-43-22.
- 284 Chiang H.I., Li J.R., Liu C.C. et al. An Association of Gut Microbiota with Different Phenotypes in Chinese Patients with Rheumatoid Arthritis // J Clin Med. – 2019. – Vol. 8, №11. – P. 1770-1-1770-19.
- 285 Lee J.Y., Manna M., Kim Y. et al. Comparative Analysis of Fecal Microbiota Composition Between Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Patients // Genes (Basel). – 2019. – Vol. 10, №10. – P. 748-1-748-15.
- 286 Muñoz-Pedrogo D.A., Chen J., Hillmann B. et al. An Increased Abundance of Clostridiaceae Characterizes Arthritis in Inflammatory Bowel Disease and Rheumatoid Arthritis : A Cross-sectional Study // Inflamm Bowel Dis. – 2019. – Vol. 25, №5. – P. 902-913.
- 287 König M.F., Abusleme L., Reinholdt J. et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis // Sci Transl Med. – 2016. – Vol. 8, №369. – P. 369ra176-1-369ra176-21.
- 288 Mikuls T.R., Payne J.B., Yu F. et al. Periodontitis and porphyromonas gingivalis in patients with rheumatoid arthritis // Arthritis Rheumatol. – 2014. – Vol. 66, №5. – P. 1090-1100.
- 289 Scher J.U., Bretz W.A., Abramson S.B. Periodontal disease and subgingival microbiota as contributors for rheumatoid arthritis pathogenesis: Modifiable risk factors? // Current Opinion in Rheumatology. Lippincott Williams and Wilkins. – 2014. – Vol. 26, №4. – P. 424-429.
- 290 Arumugam M., Raes J., Pelletier E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome // Nature. – 2011. – Vol. 473, №7346. – P. 174-180.
- 291 Wu G.D., Chen J., Hoffmann C. et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with // Science. – 2011. – Vol. 334, №6052. – P. 105-109.
- 292 Bushman F.D., Lewis J.D., Wu G.D. Diet, gut enterotypes and health: is there a link? // Nestle Nutr Inst Workshop Ser. – 2013. – Vol. 77. – P. 65-73.
- 293 Lim M.Y., Rho M., Song Y.M. et al. Stability of gut enterotypes in Korean monozygotic twins and their association with biomarkers and diet // Sci Rep. – 2014. – Vol. 4. – P. 7348-1-7348-14.

- 294 Li J., Fu R., Yang Y. et al. A metagenomic approach to dissect the genetic composition of enterotypes in Han Chinese and two Muslim groups // *Syst. Appl. Microbiol.* Elsevier GmbH. – 2018. – Vol. 41, №1. – P. 1-12.
- 295 Liang C., Tseng H.C., Chen H.M. et al. Diversity and enterotype in gut bacterial community of adults in Taiwan // *BMC Genomics.* – 2017. – Vol. 18, Suppl 1. – P. 932-1-932-16.
- 296 Kushugulova A., Forslund S.K., Costea P.I. et al. Metagenomic analysis of gut microbial communities from a Central Asian population // *BMJ Open.* – 2018. – Vol. 8, №7. – P. e021682-1-e021682-19.
- 297 Artacho A., Isaac S., Nayak R. et al. The Pretreatment Gut Microbiome Is Associated With Lack of Response to Methotrexate in New-Onset Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheumatol.* – 2021. – Vol. 73, №6. – P. 931-942.
- 298 Yan H., Su R., Xue H. et al. Pharmacomicrobiology of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Gut Microbiome as Predictor of Therapeutic Response // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 789334-1-789334-33.
- 299 Gupta V.K., Cunningham K.Y., Hur B. et al. Gut Microbiome Predicts Clinically Important Improvement in Patients with Rheumatoid Arthritis // *Genome Med.* – 2021. – Vol. 13, №1. – P. 149-1-149-32.
- 300 Han M., Zhang N., Mao Y. et al. The Potential of Gut Microbiota Metabolic Capability to Detect Drug Response in Rheumatoid Arthritis Patients // *Front. Microbiol.* – 2022. – Vol. 8, №13. – P. 839015-1-839015-19.
- 301 Jin Z.L., Chen X.C. Changes in intestinal flora and serum inflammation in rheumatoid arthritis rats and the effects of probiotics // *Eur. Rev. Med. - Pharmacol. Sci.* – 2020. – Vol. 24, №22. – P. 11820-11826.
- 302 Ferro M., Charneca S., Dourado E. et al. Probiotic Supplementation for Rheumatoid Arthritis: A Promising Adjuvant Therapy in the Gut Microbiome Era // *Front. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 23, №12. – P. 711788-1-711788-33.
- 303 Pan H., Guo R., Ju Y. et al. A single bacterium resurrects the microbiome-immune balance to protect bones from destruction in a rat model of rheumatoid arthritis // *Microbiome.* – 2019. – Vol. 7, №1. – P. 107-1-107-20.
- 304 Демографические данные по Республике Казахстан // <https://www.stat.gov.kz/kz>. 19.03.2020
- 305 Prevoo M.L., van 't Hof M.A., Kuper H.H. et al. Modified Disease Activity Scores That Include Twenty-Eight-Joint Counts. Development and Validation in a Prospective Longitudinal Study of Patients with Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Rheum.* – 1995. – Vol. 38, №1. – P. 44-48.
- 306 Issilbayeva A., Ainabekova B., Zhetkenev S. et al. Association Study of Anticitrullinated Peptide Antibody Status with Clinical Manifestations and SNPs in Patients Affected with Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study // *Dis. Markers.* – 2022. – Vol. 2022. – P. 2744762-1-2744762-15.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Авторские свидетельства

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  **РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

СВИДЕТЕЛЬСТВО
О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ
№ 14601 от «22» января 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
ИСИЛЬБАЕВА АРГУЛЬ АСЕТОВНА, АЙНАБЕКОВА БАЯН АЛЪКЕНОВНА, МЕЙРАМОВА ӘСЕЛ
МЕРЕКЕКЫЗЫ, АХМЕТОВА ЖАНАР БАГДАТОВНА

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **«Оценка вероятности прогнозирования рентгенологической стадии поражения суставов у пациентов с ревматоидным артритом женского пола»**

Дата создания объекта: **05.11.2020**





Күжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құжық" бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП Оспанов Е.К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 14602 от «22» января 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
ИСИЛЬБАЕВА АРГУЛЬ АСЕТОВНА, АЙНАБЕКОВА БАЯН АЛЪКЕНОВНА, МЕЙРАМОВА ӘСЕЛ
МЕРЕКЕКЫЗЫ, АХМЕТОВА ЖАНАР БАГДАТОВНА

Вид объекта авторского права: произведение науки

Название объекта: «Расчет оценки вероятности прогнозирования развития деформаций крупных и
мелких суставов у пациентов с ревматоидным артритом женского пола»

Дата создания объекта: 05.11.2020



Құжат түпнұсқалығын: <http://www.kazpatent.kz/rz> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е.К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 14603 от «22» января 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
**ПСИДЬБАЕВА АРГУЛЬ АСЕТОВНА, АЙНАБЕКОВА БАЯН АЛЪКЕНОВНА, МЕЙРАМОВА ӘСЕЛ
МЕРЕКЕКЫЗЫ, АХМЕТОВА ЖАНАР БАГДАТОВНА**

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **«Исследование микробиомных маркеров ревматоидного артрита в казахстанской
популяции»**

Дата создания объекта: **05.11.2020**



Құжат түпнұсқалығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Осланов Е.К.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 14604 от «22» января 2021 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
ПСИЛЬБАЕВА АРГУЛЬ АСЕТОВНА, АЙШАБЕКОВА БАЯН АЛЪКЕНОВНА, МЕЙРАМОВА ӘСЕЛ
МЕРЕКЕКЫЗЫ, АХМЕТОВА ЖАНАР БАГДАТОВНА

Вид объекта авторского права: произведение науки

Название объекта: «Исследование генетических маркеров ревматоидного артрита в казахстанской
популяции»

Дата создания объекта: 05.11.2020



Құжат тұңғысқалығын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте [kazpatent.kz](http://www.kazpatent.kz)
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Оспанов Е.К.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акты внедрения

АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы
ГКП на ПХВ Городская поликлиника №12 г. Нур-Султан, отделение узких специалистов, НАО «Медицинский университет Астана», ЧУ «National Laboratory Astana»

Наименование предложения: прогнозирование вероятности рентгенологической стадии поражения суставов при ревматоидном артрите среди лиц женского пола.

Работа включена в инициативном порядке.

Заимствована из диссертационной работы Исильбаева А.А. на соискание степени доктора философии (PhD) на тему "Клинические особенности течения и состояние микробиоценоза у пациентов с ревматоидным артритом".

Форма внедрения: расчет вероятности рентгенологической стадии поражения суставов с использованием формулы вычетов дискриминантных функций F1 и F2, с расчетом координат на территориальной карте на основе мультиномиального дискриминантного анализа, включающего в себя длительность заболевания (в годах) и уровень С-реактивного белка (мг/л).

Ответственный за внедрение и исполнитель: зам. главного врача по лечебно-профилактической работе Болеубаева М.Т., зав. отделением узких специалистов Байтаков Р.Т., проф., д.м.н. Айнабекова Б.А., к.м.н. Карина К.К., к.м.н. Ахметова Ж.Б., доктор PhD Мейрамова Ә.М., врач ревматолог, докторант кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии Исильбаева А.А.

Эффективность внедрения: прогнозирование вероятности рентгенологической стадии поражения суставов у пациентов, страдающих ревматоидным артритом женского пола позволяет выявить группу женщин с различной степенью эрозирования суставной поверхности и обладает чувствительностью теста (после перекрестной проверки) при прогнозировании I рентгенологической стадии РА 71,6%, II стадии – 29,4%, III стадии – 37,5% и IV стадии – 63,6%.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрения – внедрение рекомендуется к широкому применению.

Срок внедрения: IV-квартал 2020 года

Председатель комиссии:

Зам.гл.врача по лечебно-профилактической работе
ГКП на ПХВ Городской поликлиника №12
г. Нур-Султан



Болеубаева М.Т.

Ответственные за внедрение: врач ревматолог, докторант кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии Исильбаева А.А., зам. главного врача по лечебно-профилактической работе Болеубаева М.Т., зав. отделением узких специалистов Байтаков Р.Т., проф., д.м.н. Айнабекова Б.А., к.м.н. Карина К.К., к.м.н. Ахметова Ж.Б., доктор PhD Мейрамова Ә.М.

Исполнители: врач ревматолог, докторант кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии Исильбаева А.А.

АКТ
внедрения результатов научно-исследовательской работы
ГКП на ПХВ Городская поликлиника №12 г. Нур-Султан, отделение узких специалистов, НАО «Медицинский университет Астана», ЧУ «National Laboratory Astana»

Наименование предложения: прогнозирование вероятности развития деформаций крупных и мелких суставов у пациентов, страдающих ревматоидным артритом женского пола.

Работа включена в инициативном порядке.

Заимствована из научно-исследовательской работы по ГФ молодых ученых по научным и (или) научно-техническим проектам на 2020-2022 годы на тему «Определение микробиомных и геномных биомаркеров ревматоидного артрита в Казахстанской популяции»

Форма внедрения: расчет вероятности развития деформации крупных и мелких суставов с использованием формулы бинарной регрессионной модели, включающей в себя возраст дебюта заболевания и симметричность поражение суставов.

Ответственный за внедрение и исполнитель: – зам. главного врача по лечебно-профилактической работе Болеубаева М.Т., зав. отделением узких специалистов Байтаков Р.Т., проф., д.м.н. Айнабекова Б.А., к.м.н. Карина К.К., к.м.н. Ахметова Ж.Б., доктор PhD Мейрамова Ә.М., врач ревматолог, докторант кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии Исильбаева А.А.

Эффективность внедрения: прогнозирование вероятности развития деформации крупных и мелких суставов у пациентов, страдающих ревматоидным артритом женского пола с порогом классификации равным 0,5 позволяет выявить группу женщин с высоким риском развития деформаций и обладает чувствительностью теста 71,7% , специфичностью 70%, прогностической ценностью положительного результата 40%, прогностической ценностью отрицательного результата 28,2%, диагностической точностью 70,8%.

Предложения, замечания учреждения, осуществляющего внедрения – внедрение рекомендуется к широкому применению.

Срок внедрения: IV-квартал 2020 года

Председатель комиссии:

Зам.гл.врача по лечебно-профилактической работе
ГКП на ПХВ Городская поликлиника №12
г. Нур-Султан



Болеубаева М.Т.

Ответственные за внедрение: врач ревматолог, докторант кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии Исильбаева А.А., зам. главного врача по лечебно-профилактической работе Болеубаева М.Т., зав. отделением узких специалистов Байтаков Р.Т., проф., д.м.н. Айнабекова Б.А., к.м.н. Карина К.К., к.м.н. Ахметова Ж.Б., доктор PhD Мейрамова Ә.М.

Исполнители: врач ревматолог, докторант кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии Исильбаева А.А.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Выписка из протокола заседания этического комитета Назарбаев Университет



г. Астана, ул. Кабанбай батыра, 53
тел: (7172) 70-93-44

**Выписка из
ПРОТОКОЛА №03-2019**
заседания Локальной этической комиссии
ЧУ «National Laboratory Astana» от 05.08.2019

Место проведения: г. Астана, ул. Кабанбай батыра, 53, блок S1, конференц-зал
Дата проведения: 05.08.2019

Председатель: Ермекбаева Б.А.
Секретарь: Кайырлыкызы А.

Присутствовали члены Комиссии: Ермекбаева Б.А., Акильжанова А.Р., Гуляев А.Е., Берикханова К.Е., Кушугулова А.Р., Кайырлыкызы А.

Отсутствовали члены Комиссии по уважительной причине: Нурмагамбетова Б.К., Жакупов А.Т.

Присутствовали: Умбаев Б.А., Каиров У.Е., Кожамметов С.С., Косумов А.К., Ережепов Д.А., Жужасарова А.А., Турдалина Б.Р., Сергазы Ш.Д., Сыпабекова М., Мейрамова А.М.

Повестка дня:

1. Рассмотрение и обсуждение заявок для участия на конкурсе молодых ученых МОН РК на 2020-2022
Заявитель: главный исследователь Мейрамова А.М.
Планируемые сроки проведения исследования: 2020- 2022гг.

Слушали:

1. Доклад главного исследователя Мейрамовой А.М. на тему «Определение микробиомных и геномных биомаркеров ревматоидного артрита в казахстанской популяции»

Члены Комиссии обсудили протокол исследования, получили ответы на заданные вопросы. Проведено открытое голосование. В голосовании принимали участие 6 из 8 членов Комиссии. Результаты голосования: «за одобрение» - 6 человек, «против одобрения» - 0 человек, воздержались – 0 человек.

Решение:

1. Одобрить протокол исследования с вовлечением людей добровольцев, как соответствующий требованиям биоэтики, предъявляемым к научно-исследовательским работам с рекомендацией к дальнейшей работе.

Председатель Локальной этической комиссии  Б. Ермекбаева

Секретарь Локальной этической комиссии  А. Кайырлыкызы



ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Заключение Этической комиссии НАО МУА

Заключение Этической комиссии НАО «Медицинский университет Астана»

1.	ФИО докторанта	Исильбаева Аргуль Асетовна
2.	Специальность (образовательная программа) докторантуры	8D10102 – МЕДИЦИНА
3.	Период обучения в докторантуре	01.09.2019-01.07.2022
4.	Тема диссертации, дата утверждения	«Клинические особенности течения и состояние микробиоценоза у пациенток с ревматоидным артритом» Утверждена на заседании кафедры 13.09.2019; на межкафедральном совещании 28.10.2019; на заседании Сената 15.11.2019
5.	Данные о научных консультантах - Ф.И.О. (при его наличии), должности и места работы, ученые степени, гражданство	д.м.н., профессор Айнабекова Б.А. , зав. кафедры внутренних болезней с курсом гастроэнтерологии, эндокринологии и пульмонологии, НАО МУА, Нур-Султан, Казахстан. д.м.н. Кушугулова А.Р. руководитель лаборатории микробиома человека и долголетия, директор центра наук о жизни ЧУ «National Laboratory Astana», Назарбаев Университет, Нур-Султан, Казахстан. MD, therapist, immunologist Zueva E.E. , Ariel University, medical faculty, Ashkelon, Israel
6.	Объекты исследования	В исследовании приняли участие 196 человек. Основную группу исследования составили пациенты женского пола с ревматоидным артритом в возрасте 30-55 лет в количестве 82 человек. В контрольную группу лиц вошли здоровые женщины, не имевшие семейный анамнез по ревматоидному артриту и другим аутоиммунным заболеваниям, в количестве 114 человек.
7.	Нарушения в процессе планирования, оценки, отбора и проведения научных исследований	Нарушения не выявлены.
8.	Нарушения в процессе распространения результатов научных исследований	Нарушения не выявлены.
9.	Каким образом проводилась защита прав, безопасности и благополучия объектов исследования (в случае наличия объектов живой природы и среды обитания)?	Всем участникам исследования было предложено информированное согласие на участие в исследовании после проведенной разъяснительной беседы о целях и плане исследования (информация об исследовании, и копия информированного согласия были выданы на руки участников). Подписавшие информированное согласие 196 участников были включены в исследование. Все включенные в исследование участники проходили процесс регистрации с присвоением индивидуального кода с целью соблюдения принципов конфиденциальности.

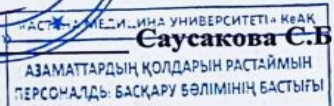
Председатель Этической комиссии



Рахметова В.С.

Секретарь Этической комиссии

Исх.№32, протокол №3 от 30.03.2022 г., г.Нур-Султан



Саусакова С.Б.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Этапы выделения ДНК из образцов крови

1. Для объема образца 300 мкл: было добавлено 900 мкл раствора для лизиса клеток в стерильную 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.

Важно: кровь должна быть собрана в пробирки с ЭДТА, гепарином или цитратом, чтобы предотвратить свертывание.

2. Аккуратно покачивали пробирку с кровью до полного перемешивания; затем кровь переносилась в пробирку с раствором для лизиса клеток. Пробирка переворачивалась 5–6 раз, чтобы перемешать.

3. Смесь инкубировалась в течение 10 минут при комнатной температуре (инвертировалась 2-3 раза, один раз во время инкубации), чтобы лизировать эритроциты. Центрифугирование при $13000-16000 \times g$ в течение 20 секунд при комнатной температуре.

4. Удалялось и выбрасывалось как можно больше надосадочной жидкости, не нарушая видимый белый осадок. Примерно 10–20 мкл остаточной жидкости оставалось в 1,5 мл пробирке (300 мкл образца).

Если образец крови был заморожен, шаги 1–4 повторялись до тех пор, пока осадок не становился белым. Не исключена некоторая потеря ДНК из замороженных образцов.

5. Вортексация пробирки, пока лейкоциты не ресуспендировались (10–15 секунд).

Полностью ресуспендировались лейкоциты для эффективного лизиса клеток.

6. Раствор (nuclei lysis solution) (300 мкл на 300 мкл образца) добавлялся в пробирку, содержащую ресуспендированные клетки. Раствор пипетировался 5–6 раз, чтобы лейкоциты лизировались. Содержимое в пробирке становилось вязким. Если после смешивания были видны скопления клеток, проводилась инкубация раствора при $37^\circ C$ до тех пор, пока они не разрушались.

Если комки все еще были видны через 1 час, добавлялся дополнительный раствор (nuclei lysis solution) (100 мкл для объема образца 300 мкл) и инкубация повторялась.

7. Добавлялся раствор для осаждения белков (100 мкл для объема образца 300 мкл) в раствор (nuclei lysis solution) и встряхивался в течение 10–20 секунд.

Примечание. Если на этапе 6 был добавлен дополнительный раствор (nuclei lysis solution), добавлялся в общей сложности 130 мкл раствора для осаждения белка.

9. Далее проводилось центрифугирование при $13000-16000 \times g$ в течение 3 минут при комнатной температуре.

Визуализировался темно-коричневый осадок белка. Если гранулы не наблюдались, то возвращались к разделу 4.

10. Супернатан переносился в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку, содержащую 300 мкл изопропанола (комнатной температуры).

Примечание. Некоторое количество супернатанта могло оставаться в начальной пробирке, содержащей осадок белка. Остаточная жидкость оставалась в пробирке, чтобы избежать загрязнения раствора ДНК осажденным белком.

11. Раствор аккуратно перемешивался, перевернув, пока белые нити ДНК не сформировывали видимую массу.

12. Центрифугирование при скорости 13000-16000 × g в течение 1 минуты при комнатной температуре. ДНК визуализировалось как маленький белый пеллет.

13. Супернатан декантировался и добавлялся один объем образца 70% этанола комнатной температуры к ДНК. Пробирка аккуратно переворачивалась несколько раз, чтобы промыть осадок ДНК и боковые стороны пробирки микроцентрифуги. Далее центрифугирование, как в шаге 12.

14. Этанол тщательно аспирировался, используя либо вытянутую пипетку Пастера, либо кончик пипетки для секвенирования. В этот момент осадок ДНК очень рыхлый, поэтому соблюдалась осторожность, чтобы избежать попадания осадка в пипетку. Пробирка переворачивалась на чистую абсорбирующую бумагу и высушивался пеллет в течение 10-15 минут.

15. Добавлялся раствор для регидратации ДНК (100 мкл для объема образца 300 мкл) в пробирку и проводилась регидратация ДНК, путем инкубирования при 65°C в течение 1 часа. Раствор периодически перемешивался, с осторожными постукиваниями по пробирке.

Альтернативно, регидратация ДНК проводилась, путем инкубирования раствора в течение ночи при комнатной температуре или при 4°C.

16. ДНК хранилось при 2-8°C, согласно протоколу.

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

RT-PCR с использованием технологии TaqMan

1. Для подготовки ДНК-библиотек в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку заливалась реакционная смесь для RT PCR (рисунок Ж.1).

Компонент реакционной смеси	Объем на 20 мл
Единичная реакция	Репликация на 4
20× TaqMan® Gene Expression Assay	1,0 5,0
2× TaqMan® Gene Expression Master Mix	10,0 50,0
cDNA template (1 to 100 ng)	4,0 20,0
RNase-free water	5,0 25,0

Рисунок Ж.1 – Подготовка реакционной смеси для RT PCR

2. Пробирка закрывалась крышкой и переворачивалась несколько раз, с целью смешивания компонентов.

3. Проводилось центрифугирование пробирки (быстро).

Далее загружался планшет для RT-PCR:

1. 20 мкл реакционной смеси переносился в каждую лунку 96-луночной тарелки.

2. Поверхность тарелки закрывалась специальной пленкой.

3. Проводилось центрифугирование тарелки (быстро).

4. Тарелка устанавливалась в аппарат TaqMan (Applied Biosystems 7500, Foster City, CA) и проводился RT-PCR.

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Этапы выделения ДНК из образцов слюны и кала

1. 1 мл слюны или кала заливается в пробирки ZR BashingBead™ Lysis Tubes и добавляется раствор 750 мкл ZymoBIOMICS™ Lysis Solution, плотно закрывается крышка пробирки.
2. Пробирка гомогенизировалась с помощью аппарата TissueLyser QIAGEN в теч 5 мин.
3. Далее проводилось центрифугирование пробирки на скорости 10000 в течение 1 мин.
4. В новую пробирку добавлялся фильтрат с шага 3 и к нему добавлялся 1,2 мкл раствора ZymoBIOMICS™ DNA Binding Buffer.
5. 800 мкл супернатанта с шага 4 переносился в микроцентрифужную пробирку, заранее в нее устанавливался фильтр Zymo-Spin™ IC-Z Column, и проводилось центрифугирование на скорости 10000 в течение 1 мин.
6. Содержимое пробирки выливалось и повторялся шаг 5.
7. Далее в новую микроцентрифужную пробирку устанавливался фильтр Zymo-Spin™ IC-Z Column с шага 5, добавлялся 400 мкл раствора ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 1 и проводилось центрифугирование на скорости 10000 в течение 1 мин, после содержимое пробирки выливалось, фильтр устанавливался на место.
8. В пробирки с фильтром Zymo-Spin™ IC-Z Column с 7 шага добавлялся 700 мкл ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 и проводилось центрифугирование на скорости 10000 в течение 1 мин, после содержимое пробирки выливалось, фильтр устанавливался на место.
9. В Zymo-Spin™ IC-Z Column добавлялся 200 мкл ZymoBIOMICS™ DNA Wash Buffer 2 и проводилось центрифугирование на скорости 10000 в течение 1 мин.
10. Фильтр Zymo-Spin™ IC-Z Column переносился в чистую 1.5 мл микроцентрифужную пробирку и добавлялся 20 мкл ZymoBIOMICS™ DNase/Rnase Free Water в центр фильтрата и инкубировался 1 мин. Затем проводилось центрифугирование на скорости 10000 в течение 1 мин.
11. В новую микроцентрифужную пробирку устанавливался Zymo-Spin™ II-μHRC Filter и добавлялось 600 мкл ZymoBIOMICS™ HRC Prep Solution. Затем проводилось центрифугирование на скорости 8000 в течение 3 мин.
12. Эльюированное ДНК с шага 10 переносилось в чистую 1.5 мл микроцентрифужную пробирку с подготовленными Zymo-Spin™ II-μHRC Filter и проводилось центрифугирование на скорости 16000 в течение 3 мин.

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Подготовка ДНК-ампликонов с использованием набора Nextflex 16S

ПЦР 1 Амплификация

Для каждого образца, объединялись все реагенты в ПЦР планшете, во льду.

К необходимому количеству геномной ДНК со свободной от нуклеаз водой добавлялся 12 мкл раствор PCR master mix, общий объем составлял 50 мкл. Раствор перемешивался и наклеивалась пленка на ПЦР планшет и планшет помещался в термоциклер.

Далее проводилась очистка смеси ПЦР 1 с использованием AMPure XP шариков.

Для каждого образца, объединялись все реагенты в ПЦР планшете, во льду, 36 мкл очищенный ПЦР 1 продукт, 12 мкл PCR master mix, 2 мкл Nextflex PCR II Barcoded primer mix, 50 мкл Общий объем. Раствор перемешивался и наклеивалась пленка на ПЦР планшет и планшет помещался в термоциклер. Далее проводилась очистка смеси ПЦР 2 с использованием AMPure XP шариков.

Затем проводилось количественное определение библиотеки на приборе Qubit 2.0 с использованием набора для анализа dsDNA BR Qubit (ThermoFisher, номер по каталогу 32853).

Валидация библиотек с помощью Agilent Bioanalyzer 2100, с использованием набора Agilent High Sensitivity DNA Kit:

- проводилась вортексация High Sensitivity DNA dye concentration;
- вносилось 15 мкл High Sensitivity DNA dye concentration в высокочувствительный ДНК шель матрикс;
- проводилась вортексация в теч 10 сек.;
- гель переносился на спин-фильтр;
- проводилось центрифугирование в течение 10 мин.

Далее по протоколу маркеры и образцы вносились на поверхность High Sensitivity DNA chip.