

УДК 577.21

Семейный анализ сцепления и ассоциации полиморфизма генов *DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* с рассеянным склерозом

О. Ю. Макарычева¹, Е. Ю. Царева^{1,2}, М. А. Судомоина^{1,2}, О. Г. Кулакова^{1,2}, Б. В. Титов^{1,2},
О. В. Быкова³, Н. В. Гольцова³, Л. М. Кузенкова³, А. Н. Бойко², О. О. Фаворова^{1,2*}

¹ФГУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Министерства здравоохранения и социального развития», 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

²ГОУ ВПО «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию», 117437, Москва, ул. Островитянова, 1

³Научный центр здоровья детей РАМН, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 2/62

*E-mail: olga_favorova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

РЕФЕРАТ В патогенезе рассеянного склероза (РС) – хронического воспалительного аутоиммунного заболевания центральной нервной системы (ЦНС) – важную роль играют белки иммунной системы, а также белки, участвующие в проникновении активированных клеток иммунной системы в ЦНС. Мы исследовали сцепление и ассоциацию с РС полиморфных участков следующих генов иммунной системы: *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5* и *RANTES*, а также генов, кодирующих матриксную металлопротеиназу 9 (*MMP9*) и тканевый ингибитор металлопротеиназ 1 (*TIMP1*). Для анализа сцепления/ассоциации с РС полиморфных участков этих генов использовали тест неравновесной передачи аллелей (transmission disequilibrium test, TDT). В группе из членов 100 ядерных семей (больной РС и его здоровые родители), русских по этнической принадлежности, обнаружено, что аллели *HLA-DRB1*15* и *MMP9*(-1562)C* чаще передаются от здоровых родителей их больным детям, чем альтернативные аллели ($p = 0.02$ и 0.04 соответственно). Еще одним методом семейного анализа, AFBAC (affected family-based control), при сравнении распределения аллелей исследованных генов у больных РС и в контрольной группе, составленной из аллелей здоровых родителей, не переданных больным детям (по одному аллелю от каждого из родителей), подтверждена ассоциация с РС аллеля *HLA-DRB1*15*, но не *MMP9*(-1562)C*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА функциональная геномика, человек, рассеянный склероз, генотипирование, ген *CCR5*, ген *CTLA4*, ген *HLA-DRB1*, ген *IL4*, ген *RANTES*, ген *TGFB1*, ген *MMP9*, ген *TIMP1*, аллельный полиморфизм, TDT, AFBAC.

СОКРАЩЕНИЯ РС – рассеянный склероз; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЦНС – центральная нервная система; AFBAC (affected family-based control) – метод семейного анализа, в котором контрольная группа составлена из аллелей, не перенесенных от родителей больным детям; *CCR5* (*CCR5*) – рецептор 5 СС-хемокинов (его ген); *CTLA4* (*CTLA4*) – антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (его ген); *HLA-DRB* (*HLA-DRB1*) – β -цепь человеческого лейкоцитарного антигена DR (его ген 1); *IL-4* (*IL4*) – интерлейкин 4 (его ген); *MMP* (*MMP*) – матриксная металлопротеиназа (его ген); *RANTES* (*RANTES*) – хемокин, регулируемый при активации, экспрессируемый и секреторируемый нормальными Т-клетками (его ген); SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; TDT (transmission disequilibrium test) – тест неравновесной передачи аллелей; *TGF β 1* (*TGFB1*) – трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (его ген); *TIMP* (*TIMP*) – тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ (его ген).

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – тяжелое воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое, как правило, развивается в трудоспособном возрасте и приводит к инвалидизации. Этиология этого заболевания является комплексной, с вовлечением как генетических, так и внешних факторов [1]. Тип наследования РС характерен для полигенных заболеваний, развитие которых обусловлено совместным вкладом множества полиморфных генов [2]. Выявление генетических факторов риска РС может способствовать выяснению механизмов патогенеза заболевания и открыть новые возможности для его профилактики и лечения.

Хотя генетика РС активно изучается, проблема поиска генов, ассоциированных с РС, далека от своего разрешения. Это связано с природой заболевания, для которого характерны генетическая гетерогенность, особенно в различных этнических группах, и отсутствие «главного» гена. С другой стороны, поиск факторов риска РС затруднен в силу ограничений основных методов анализа. Так, анализ сцепления областей генома с РС оказался мало информативным методом вследствие его низкой чувствительности [3], а при анализе генетических ассоциаций с РС методом «случай–контроль» наблюдается низкая воспроизводимость результатов, связанная с этнической гетерогенностью рассматриваемых групп больных и здоровых, а также с влиянием факторов окружающей среды [4].

Методы семейного анализа ассоциаций позволяют исключить или уменьшить влияние этнической неоднородности сравниваемых групп больных и неродственных здоровых, а также, в определенной степени, и влияние факторов окружающей среды [5]. Один из таких методов – метод неравновесной передачи аллелей (transmission disequilibrium test, TDT) [6], в основе которого лежит анализ случаев передачи маркерного аллеля или гаплотипа от гетерозиготных родителей больным детям. Метод TDT уже использовали для анализа сцепления и ассоциации аллелей ряда генов-кандидатов с РС в разных этносах [7–10], в том числе и в русском (наши исследования [11, 12]). В последнее время этот метод стали применять не только для анализа вклада отдельных генов в развитие РС, но и в качестве инструмента при полном геномном поиске [13–15]. На семейном материале проводят также анализ ассоциаций методом AFBAC (affected family-based control), согласно которому контрольная группа составляется из набора аллелей здоровых родителей, не переданных больным потомкам (по одному аллелю от каждого из родителей) [16]. С помощью этого метода предрасположенность к РС анализировали в Италии [17, 18], Великобрита-

нии [19], Бельгии [20] и Франции [21]. Каждый из этих методов семейного анализа имеет свои достоинства и недостатки: AFBAC является более мощным методом, чем TDT, тогда как TDT позволяет полностью устранить эффекты стратификации популяции [22].

В настоящей работе на семейном материале методами TDT и AFBAC проведен анализ сцепления и ассоциации с РС генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* у этнических русских.

Многочисленные данные свидетельствуют об участии этих генов в иммунопатогенезе РС как аутоиммунного заболевания [2]. Наиболее доказано вовлечение в развитие РС тех или иных (в зависимости от этнической принадлежности популяции) аллелей гена *HLA-DRB1* класса II, который кодирует β -цепь гетеродимера, представляющего антиген CD4 Т-лимфоцитам. Также в нашу работу включен ген *CTLA4*, кодирующий антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (*CTLA4*, или CD152) – костимулирующий рецептор Т-лимфоцитов, важный негативный регулятор активности Т-клеток, который участвует в поддержании периферической Т-клеточной толерантности [23].

В развитии и регуляции характерного для РС аутоиммунного воспалительного процесса ведущую роль отводят цитокинам. В дополнение к результатам, полученным нами при анализе сцепления и ассоциации с РС аллелей генов провоспалительных цитокинов [12], в настоящей работе рассмотрены гены двух противовоспалительных цитокинов: *TGF β 1* и *IL-4*. Цитокин *TGF β 1* секретируется многими типами клеток, включая регуляторные Т-лимфоциты, астроциты, эндотелиальные клетки, а *IL-4* – в основном активированными Th2-клетками. Эти цитокины выявляются в тканях головного мозга на стадии ремиссии, а при активном прогрессирующем РС их уровень снижен [24].

Ключевым этапом развития иммунопатологического процесса при РС является нарушение гематоэнцефалического барьера и проникновение Т- и В-клеток в ЦНС. Стимуляция и направление миграции клеток различных классов во многом определяются хемокинами. В наше исследование включены гены хемокина *RANTES* (Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted), хемоаттрактанта для лимфоцитов и моноцитов, и его рецептора *CCR5*. Уровни *RANTES* и *CCR5* резко повышаются на лимфоцитах, макрофагах и микроглии в очагах демиелинизации при обострении РС [25].

Проникновение иммунных клеток в ЦНС сопровождается разрушением коллагена типа IV, служащего основой внеклеточного матрикса. В преодолении этого барьера ключевую роль играют матриксные ме-

таллопротеиназы (ММР). ММР вовлечены в различные этапы патогенеза РС: они участвуют в локальном повреждении гематоэнцефалического барьера и периваскулярной лимфоцитарной инфильтрации, в разрушении миелиновой оболочки, формировании очагов демиелинизации и в гибели аксонов [26]. Одна из основных металлопротеиназ, ММР9, экспрессируется периваскулярными мононуклеарными клетками белого вещества и вместе с другими ММР ассоциирована с моноцитами и астроцитами в очагах демиелинизации. Активность ММР контролируется тканевыми ингибиторами матриксных металлопротеиназ (ТИМР), а в спинномозговой жидкости больных РС выявлено уменьшение содержания ТИМР1 [26]. Учитывая эти данные, в нашу работу включены гены *MMP9* и *TIMP1*.

У русских больных РС и их здоровых родителей мы провели геномное типирование 18 групп аллелей гена *HLA-DRB1*, однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) 49A>G гена *CTLA4*, -509C>T гена *TGFB1*, -590C>T гена *IL4*, -403G>A гена *RANTES*, -1562C>T гена *MMP9*, 372C>T гена *TIMP1*, а также делеционно-инсерционного полиморфизма *CCR5* (w>d) («дикий тип» → делеция 32 п.н.) с последующим анализом генетической предрасположенности к РС методами TDT и AFBAC. При выборе полиморфных участков для анализа исходили из данных об их связи с уровнем и/или активностью кодируемых белков. Так, хорошо известны функциональная роль аллелей гена *DRB1* в представлении антигенов и последствия делеции в гене *CCR5*, которая приводит к продукции неактивного белка *CCR5*. Что касается анализируемых SNP, то редкие аллели генов *TGFB1*, *IL4*, *RANTES* и *MMP9* ассоциированы с повышенным образованием белкового продукта [27–30] соответственно, а у носителей аллеля А гена *CTLA4* увеличена экспрессия кодируемого белка на поверхности клеток [31]. Исключение составляет SNP 372C>T гена *TIMP1*, данные о котором отсутствуют.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

Использовали образцы периферической крови членов 104 ядерных семей, каждая из которых состояла из больного РС и его здоровых родителей. Образцы крови были собраны в Научном центре здоровья детей РАМН и в Московском городском центре рассеянного склероза. Диагноз РС поставлен согласно критериям Макдональда [32]; среди больных было 46 мужчин и 58 женщин, у всех заболевание началось (дебют) в возрасте менее 35 лет. Средний возраст к началу заболевания – 18 ± 8 лет. У 102 больных РС имел ремиттирующее течение, у двоих – первично-

прогрессирующее. Все семьи проживали в Московском регионе, оба родителя каждого больного были русскими. Во всех случаях получено информированное согласие больных и/или их родителей на участие в исследовании.

Выделение ДНК и генотипирование

Геномную ДНК выделяли из мононуклеарных клеток крови с помощью экстракции смесью фенол-хлороформ по стандартному протоколу [33].

Полиморфные участки анализируемых генов, методы генотипирования на основе ПЦР и использованные праймеры приведены в *табл. 1*. Типирование гена *HLA-DRB1* проводили методом аллель-специфической ПЦР согласно рекомендациям производителя набора (АО «ДНК Технология», Россия), с помощью которого идентифицировали группы аллелей, соответствующие серологическим специфичностям от DR1 до DR18.

Статистическая обработка результатов

Анализ сцепления и ассоциации аллелей рассматриваемых генов с РС методом TDT [6] с помощью критерия χ^2 проводили с использованием свободно распространяемой программы Haploview 3.32 для биаллельных полиморфных участков, FBAT [35] – для мультиаллельного полиморфизма гена *HLA-DRB1* и полиморфизма гена *TIMP1*, находящегося на X-хромосоме. Передачу аллелей гена больным РС детям от родителей анализировали в тех семьях, где по крайней мере один родитель был гетерозиготным по этому гену. Значимым считали различие частот перенесенных и неперенесенных аллелей при значении $\chi^2 > 3.8$ ($p < 0.05$). Для анализа методом AFBAC ассоциации аллелей рассматриваемых генов с РС составляли контрольную группу из аллелей обоих родителей, не перенесенных больным детям; значение вероятности (p) оценивали с помощью двустороннего точного критерия Фишера с применением программы GraphPAD InStat 1.12a.

Отклонение наблюдаемого распределения частот генотипов в группах больных и их здоровых родителей от равновесного распределения Харди-Вайнберга анализировали с помощью алгоритма максимизации математического ожидания (expectation maximization) с использованием программы Haploview 3.32.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ДНК всех членов 104 ядерных семей проведено геномное типирование полиморфных участков, приведенных в *табл. 1*. Из дальнейшего анализа исключили четыре семьи, в которых по результатам генотипирования отцовство не было подтверждено. Анализ частот

Таблица 1. Полиморфные участки анализируемых генов, методы генотипирования и использованные праймеры

Ген	Полиморфизм*	SNP ID	Метод анализа (ссылка)	Праймеры для ПЦР [используемая рестриктаза]
HLA-DRB1	Группы аллелей 01–18, соответствующие специфичностям DR1–DR18	-	ПЦР с АСП	из набора для амплификации HLA-DRB1 (АО «ДНК Технология», Россия)
CTLA4	SNP 49A>G (17Thr → Ala)	rs231775	ПЦР-ПДРФ [34]**	5'-AAGGCTCAGCTGAACCTGGT и 5'-CTGCTGAAACAAATGAAACCC [BstEII]
TGFB1	SNP -509C>T	rs1800469	ПЦР с АСП	5'-GGGCAACAGGACACCTGAA-3' (АСП Т), 5'-GGGCAACAGGACACCTGAG-3' (АСП С) и 5'-AAGGCATGGCACCGCTTCTG-3' (общий прямой)
IL4	SNP -590C>T	rs2243250	ПЦР с АСП	5'-СТАААСТТGGGAGAАСАТТGTC-3' (АСП С), 5'-СТАААСТТGGGAGAАСАТТGTT-3' (АСП Т) и 5'-AGTACAGGTGGCATCTTGGAAA-3' (общий обратный)
CCR5	(w → d) («дикий тип» → делеция 32 п.н.)	-	ПЦР	5'-AGGTCTTTCATTACACCTGCAGC-3' и 5'-CTTCTCATTTTCGACACCGAAGC-3'
RANTES	SNP -403G>A	rs2107538	ПЦР с АСП	5'-CCATGGATGAGGGAAAGGAGG-3' (АСП G), 5'-CCATGGATGAGGGAAAGGAGA-3' (АСП А) и 5'-AGGGAAGGGGTCTCCTCAG-3' (общий обратный)
MMP9	SNP -1562C>T	rs3918242	ПЦР-ПДРФ	5'-GCCTGGCACATAGTAGGCC-3' и 5'-CTTCTTAGCCAGCCGGCATC-3' [SphI]
TIMP1	SNP 372C>T	rs4898	ПЦР с АСП	5'-CTGTTCCAGGGAGCCACG-3' (АСП С), 5'-CTGTTCCAGGGAGCCACA-3' (АСП Т) и 5'-AGCGAGGAGTTTCTCATTTGCT-3' (общий прямой)

*Все положения SNP указаны относительно участков старта транскрипции, за исключением *CTLA4* 49A>G, где 49 – положение относительно участка старта трансляции.

**Ссылка приведена в случае, когда использовали описанную методику.

Примечание. АСП – аллель-специфический праймер; ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов.

генотипов с помощью программы Harview 3.32 показал, что у больных РС и их родителей распределение частот генотипов по всем генам соответствует равновесию Харди–Вайнберга ($p < 0.05$).

Методом TDT рассчитан показатель χ^2 , характеризующий отклонение наблюдаемых частот наследования аллелей генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* больными детьми из 100 ядерных семей от величин, ожидаемых при отсутствии взаимосвязи между аллелем и заболеванием. По величине χ^2 рассчитано значение p (табл. 2). В результате анализа обнаружено значимое сцепление/ассоциация с РС аллелей *HLA-DRB1**15 ($\chi^2 = 5.7$, $p = 0.02$) и *MMP9**(-1562)C ($\chi^2 = 4.1$, $p = 0.04$). Для остальных полиморфных участков значимых результатов не получили ($\chi^2 < 3.8$, $p > 0.05$). Методом TDT не выявлено сцепления/ассоциации ни одного из анализируемых полиморфных участков с РС в выделенных группах мужчин и женщин по отдельности.

В табл. 3 представлены результаты анализа методом AFBAC ассоциации РС с аллелями исследуемых

полиморфных участков. Сравнение частоты аллелей у больных детей и в контрольной группе, составленной из аллелей матерей и отцов, не переданных детям, выявило значимую ассоциацию РС только с аллелем *HLA-DRB1**15 ($p = 0.02$), но не с аллелями других генов.

Несмотря на ряд преимуществ семейного ассоциативного анализа перед популяционным, во всем мире, и тем более в России, такие исследования относительно редки из-за сложности сбора материала ядерных семей. Помимо проблемы неполных семей, достаточно широко встречается ложное отцовство. Так, скорее всего, по этой причине нам пришлось исключить из исследования четыре семьи из 104.

Гены, участие которых в развитии РС мы исследовали методами семейного анализа, можно разделить на две группы по степени изученности у русских. К первой группе относятся гены *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1* и *CCR5*, ассоциацию полиморфизма которых с РС мы анализировали ранее методом «случай–контроль», формируя контрольную группу

Таблица 2. Передача детям, больным рассеянным склерозом, аллелей полиморфных участков генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*, *TGFB1*, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* от здоровых гетерозиготных родителей в 100 ядерных семьях (анализ методом TDT)

Ген	Аллель	Число гетерозиготных родителей	Передается, число случаев	Не передается, число случаев	χ^2	<i>p</i>
<i>DRB1</i>	01	35	22	13	2.3	>0.05
	04	34	16	18	0.2	>0.05
	07	36	18	18	0.0	>0.05
	08	12	4	8	1.3	>0.05
	11	53	24	29	0.5	>0.05
	13	37	18	19	0.1	>0.05
	15	70	45	25	5.7	0.02
	16	11	3	8	2.3	>0.05
<i>CTLA4</i>	A	104	51	53	0.04	>0.05
	G		53	51		
<i>TGFB1</i>	C	101	48	53	0.3	>0.05
	T		53	48		
<i>IL4</i>	C	69	32	37	0.4	>0.05
	T		37	32		
<i>CCR5</i>	w	39	20	19	0.03	>0.05
	d		19	20		
<i>RANTES</i>	G	63	31	32	0.1	>0.05
	A		32	31		
<i>MMP9</i>	C	48	31	17	4.1	0.04
	T		17	31		
<i>TIMP1**</i>	C	49	28	21	0.5	>0.05
	T		21	28		

*Данные для аллелей *DRB1*09*, *10, *12 и *14, число носителей которых среди здоровых родителей ≤ 5 (2.5%) были незначимыми и не представлены в табл. 2 и 3.

**Поскольку ген *TIMP1* находится на X-хромосоме, рассматривали передачу аллелей больным детям только от гетерозиготных матерей.

из индивидов, неродственных больным. Во вторую группу входят гены *IL4*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1*, которые ранее подробно не изучали.

Репликация (валидация) данных о вовлеченности того или иного гена в развитие заболевания на независимых выборках считается в настоящее время непременным условием для признания полученных результатов мировым научным сообществом. В нашей работе это требование оказалось полностью выполненным для генов первой группы. Выявленная методами TDT и AFBAC ассоциация PC у русских с аллелем *DRB1*15* HLA класса II показана нами ранее в популяционных исследованиях [36, 37]. В то же время мы не наблюдали ассоциации PC с аллелями генов *CTLA4*, *TGFB1* и *CCR5* ни при семейном анализе в этой работе, ни при исследовании методом «случай–контроль» на независимых выборках неродственных индивидов [37–39].

Ранее с помощью метода TDT мы показали также сцепление/ассоциацию аллеля *DRB1*15* HLA класса II с PC у детей и подростков (так называемый ювенильный PC с дебютом в возрасте моложе 15 лет) [11]. Поскольку мы располагали ДНК всего 39 ядерных семей, анализ проводили как для биаллельного локуса, сравнивая носителей аллеля *DRB1*15* с носителями этого аллеля (т.е. с носителями всех других аллелей гена *DRB1*). В настоящей работе впервые проведен анализ сцепления и ассоциации с PC всех исследуемых аллелей мультиаллельного полиморфизма гена HLA-*DRB1* у русских и подтверждена не только ассоциация, но и сцепление с PC аллеля *DRB1*15*, причем независимо от возраста дебюта.

Данные об ассоциации с PC полиморфизма *CCR5* (w→d) [40–42] и SNP 49A>G *CTLA4* у других европеоидов [43–45] противоречивы, тогда как ассоциации SNP –509C>T *TGFB1* с PC не наблюдали [46–48].

Таблица 3. Семейный анализ методом АFBAC ассоциации с рассеянным склерозом аллелей генов HLA-DRB1, CTLA4, TGFB1, IL4, CCR5, RANTES, MMP9 и TIMP1 в 100 ядерных семьях

Ген	Аллель	Число (%) аллелей у больных РС (n = 200)	Число (%) аллелей, не переданных больным детям от родителей (n = 200)	p
DRB1	01	25 (12.5)	16 (8)	>0.05
	04	22 (11.0)	25 (12.5)	>0.05
	07	22 (11.0)	22 (11.0)	>0.05
	08	5 (2.5)	9 (4.5)	>0.05
	11	25 (12.5)	30 (15)	>0.05
	13	21 (10.5)	22 (11)	>0.05
	15	50 (25)	30 (15)	0.02
	16	3 (1.5)	8 (4)	>0.05
CTLA4	A	113 (57)	103 (52)	>0.05
	G	87 (43)	97 (48)	
TGFB1	C	132 (66)	137 (69)	>0.05
	T	68 (34)	63 (31)	
IL4	C	158 (79)	165 (83)	>0.05
	T	42 (21)	35 (17)	
CCR5	w	179 (90)	178 (89)	>0.05
	d	21 (10)	22 (11)	
RANTES	G	163 (82)	164 (82)	>0.05
	A	37 (18)	36 (18)	
MMP9	C	120 (60)	105 (53)	>0.05
	T	80 (40)	95 (47)	
TIMP1	C	88 (56)	80 (55)	>0.05
	T	68 (44)	65 (45)	

Что касается гена DRB1, то он является главным генетическим фактором риска РС у всех европеоидов, хотя в некоторых средиземноморских популяциях обнаружены ассоциации РС не с DRB1*15, а с другими аллелотипами [2].

Отсутствие индивидуальной ассоциации полиморфных участков генов CTLA4, TGFB1 и CCR5 с РС не исключает их возможной роли как генетических факторов риска заболевания в составе сочетаний нескольких аллелей/генотипов. Действительно, аллели CTLA4*49G, TGFB1*(-509)C и CCR5*d входят в состав предрасполагающих к РС би- и триаллельных сочетаний с аллелями других генов, найденных нами с помощью алгоритма APSampler [37]. В других работах выявлены ассоциированные с РС у европеоидов сочетания аллелей генов CTLA4 и TGFB1 [2]. Вопрос о том, чем определяется ассоциация аллельных сочетаний с полигенными заболеваниями – аддитивностью вклада отдельных генов или ген-генными взаимодействиями – остается открытым.

Среди генов, которые мы впервые типировали методом TDT в выборке русских больных РС, показана неслучайная передача от здоровых родителей

больному ребенку аллеля MMP9*(-1562)C. С предположением об участии этого аллеля в развитии РС согласуются результаты, полученные на других популяциях славян – в Сербии [49] и Чехии [50], в которых наблюдалось значимое снижение частоты аллеля T у больных РС по сравнению со здоровыми индивидами. Однако в нашей работе эти результаты не получили подтверждения методом АFBAC, а по данным [51] у поляков аллель T выступает в качестве аллеля предрасположенности к РС. Таким образом, вопрос об участии гена MMP9 в формировании предрасположенности к РС требует дальнейшего изучения.

Мы не выявили ассоциации полиморфных участков генов IL4, RANTES и TIMP1 с РС при использовании двух методов семейного анализа. Опубликованы данные, согласно которым в Германии SNP -590C>T гена IL4 ассоциирован с РС, особенно у женщин [52]. У испанцев с РС ассоциирован SNP 33C>T гена IL4, находящийся в полном неравновесии по сцеплению с SNP -590C>T этого гена [53]. Результаты исследования, проведенного в Иране, согласуются с нашими данными об отсутствии сцепления/ассоциации участка 33C>T IL4 с РС [54]. Связь SNP -403G>A

RANTES с РС исследована мало, однако в единственной найденной нами работе наблюдали ассоциацию этого полиморфизма с РС у европеоидов [55]. Данные об анализе участка 372С>Т гена *TIMP1* при РС не опубликованы.

ВЫВОДЫ

В настоящей работе методами семейного анализа сцепления и/или ассоциации, позволяющими исключить или уменьшить влияние возможной этнической неоднородности использованной выборки на полученные результаты, проанализирована роль полиморфных участков генов *HLA-DRB1*, *CTLA4*,

TGFB1, *IL4*, *CCR5*, *RANTES*, *MMP9* и *TIMP1* в развитии полигенного заболевания – РС, у этнических русских. Полученные методом TDT данные свидетельствуют о сцеплении/ассоциации аллелей *DRB1*15* и *MMP9*(-1562)C* с РС, а метод АФВАС подтвердил ассоциацию *DRB1*15* с этим заболеванием. Проведенное исследование указывает на перспективность изучения полигенных заболеваний с использованием семейного анализа. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 05-04-48982 и 08-04-01834).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dyment D.A., Ebers G.C., Sadovnick A.D. // *Lancet Neurol.* 2004. V. 3. № 2. P. 104–110.
- Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н. // *Генетика.* 2010. Т. 46. № 3. С. 302–313.
- Risch N.J. // *Nature.* 2000. V. 405. № 6788. P. 847–856.
- Hattersley A.T., McCarthy M.I. // *Lancet.* 2005. V. 366. № 9493. P. 1315–1323.
- Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J. // *Am. J. Hum. Genet.* 1993. V. 52. № 3. P. 506–516.
- Spielman R.S., Ewens W.J. // *Am. J. Hum. Genet.* 1996. V. 59. № 5. P. 983–989.
- Marrosu M.G., Murru R., Costa G., Melis M.C., Rolesu M., Schirru L., Solla E., Cuccu S., Secci M.A., Whalen M.B., et al. // *BMC Genet.* 2007. V. 8. P. 25.
- Cuturier N., Gourraud P.A., Cournu-Rebeix I., Gout C., Bucciarelli F., Edan G., Babron M.C., Clerget-Darpoux F., Clanet M., Fontaine B., Brassat D. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2009. V. 17. № 6. P. 844–847.
- D'Alfonso S., Bolognesi E., Guerini F.R., Barizzone N., Bocca S., Ferrante D., Castelli L., Bergamaschi L., Agliardi C., Ferrante P., et al. // *Genes Immun.* 2008. V. 9. № 1. P. 7–15.
- Chao M.J., Barnardo M.C., Lui G.Z., Lincoln M.R., Ramagopalan S.V., Herrera B.M., Dyment D.A., Sadovnick A.D., Ebers G.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 16. P. 1951–1958.
- Boiko A.N., Gusev E.I., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Bikova O.V., Maslova O.I., Guseva M.R., Boiko S.Y., Guseva M.E., Favorova O.O. // *Neurology.* 2002. V. 58. № 4. P. 658–660.
- Макарычева О.Ю., Царева Е.Ю., Судомоина М.А., Кулакова О.Г., Быкова О.В., Гольцова Н.В., Кузенкова Л.М., Бойко А.Н., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология.* 2010. Т. 44. № 5. С. 824–830.
- Hafner D.A., Compston A., Sawcer S., Lander E.S., Daly M.J., De Jager P.L., de Bakker P.I., Gabriel S.B., Mirel D.B., Ivinson A.J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2007. V. 357. № 9. P. 851–862.
- Willer C.J., Dyment D.A., Cherny S., Ramagopalan S.V., Herrera B.M., Morrison K.M., Sadovnick A.D., Risch N.J., Ebers G.C. // *J. Hum. Genet.* 2007. V. 52. № 12. P. 955–962.
- Giedraitis V., Modin H., Callander M., Landtblom A.M., Fossdal R., Stefansson K., Hillert J., Gulcher J. // *Genes Immun.* 2003. V. 4. № 8. P. 559–563.
- Thomson G. // *Am. J. Hum. Genet.* 1995. V. 57. № 2. P. 487–498.
- Liguori M., Sawcer S., Setakis E., Compston A., Giordano M., D'Alfonso S., Mellai M., Malferrari G., Trojano M., Livrea P., et al. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 97–100.
- Lampis R., Morelli L., Congia M., Macis M.D., Mulargia A., Loddo M., De Virgili S., Marrosu M.G., Todd J.A., Cucca F. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 20. P. 2959–2965.
- Yeo T.W., Roxburgh R., Maranian M., Singlehurst S., Gray J., Hensiek A., Setakis E., Compston A., Sawcer S. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 53–59.
- Goris A., Sawcer S., Vandenbroeck K., Carton H., Billiau A., Setakis E., Compston A., Dubois B. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 65–69.
- Alizadeh M., Genin E., Babron M.C., Birebent B., Cournu-Rebeix I., Yaouanq J., Dreano S., Sawcer S., Compston A., Clanet M., et al. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 143. № 1–2. P. 74–78.
- Schulze T.G., McMahon F.J. // *Am. J. Med. Genet.* 2002. V. 114. № 1. P. 1–11.
- Racke M.K., Ratts R.B., Arredondo L., Perrin P.J., Lovett-Racke A. // *J. Neuroimmunol.* 2000. V. 107. № 2. P. 205–215.
- Imitola J., Chitnis T., Khoury S.J. // *Pharmacology and Therapeutics.* 2005. V. 106. P. 163–177.
- Szczuciński A., Losy J. // *Acta Neurol. Scand.* 2007. V. 115. № 3. P. 137–146.
- Ram M., Sherer Y., Shoenfeld Y. // *J. Clin. Immunol.* 2006. V. 26. № 4. P. 299–307.
- Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M., Snieder H., Kemp P.R., Metcalfe J.C., Carter N.D., Spector T.D. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. P. 93–97.
- Rosenwasser L.J., Klemm D.J., Dresback J.K., Inamura H., Mascali J.J., Klinnert M., Borish L. // *Clin. Exp. Allergy.* 1995. V. 25. № 2. Suppl. P. 74–78.
- Nickel R.G., Casolaro V., Wahn U., Beyer K., Barnes K.C., Plunkett B.S., Freidhoff L.R., Sengler C., Plitt J.R., Schleimer R.P., et al. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. P. 1612–1616.
- Zhang B., Ye S., Herrmann S.M., Eriksson P., de Maat M., Evans A., Arveiler D., Luc G., Cambien F., Hamsten A., et al. // *Circulation.* 1999. V. 99. P. 1788–1794.
- Ligers A., Teleshova N., Masterman T., Huang W.X., Hillert J. // *Genes Immun.* 2001. V. 2. P. 145–152.
- McDonald W.I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H.P., Lublin F.D., McFarland H.F., Paty D.W., Polman C.H., Reingold S.C., et al. // *Ann. Neurol.* 2001. V. 50. № 1. P. 121–127.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 923 p.
- Marron M.P., Raffel L.J., Garchon H.J., Jacob C.O., Serrano-

- Rios M., Martinez Larrad M.T., Teng W.P., Park Y., Zhang Z.X., Goldstein D.R., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. № 8. P. 1275–1282.
35. Laird N.M., Horvath S., Xu X. // *Genet. Epidemiol.* 2000. V. 19. № 1. Suppl. P. S36–S42.
36. Судомоина М.А., Бойко А.Н., Демина Т.Л., Гусев Е.И., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология.* 1998. Т. 32. С. 291–296.
37. Favorova O.O., Favorov A.V., Boiko A.N., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Gusev E.I., Parmigiani G., Ochs M.F. // *BMC Med. Genet.* 2006. V. 7. P. 63.
38. Favorova O.O., Andreewski T.V., Boiko A.N., Sudomoina M.A., Alekseenkov A.D., Kulakova O.G., Slanova A.V., Gusev E.I. // *Neurology.* 2002. V. 59. № 2. P. 1652–1655.
39. Андреевский Т.В., Судомоина М.А., Гусев Е.И., Бойко А.Н., Алексеев А.Д., Фаворова О.О. // *Молекуляр. биология.* 2002. Т. 36. № 4. С. 643–648.
40. Ristic S., Lovrecic L., Starcevic-Cizmarevic N., Brajenovic-Milic B., Jazbec S.S., Barac-Latas V., Vejnovic D., Sepcic J., Kapovic M., Peterlin B. // *Mult. Scler.* 2006. V. 12. № 3. P. 360–362.
41. Silversides J.A., Heggarty S.V., McDonnell G.V., Hawkins S.A., Graham C.A. // *Mult. Scler.* 2004. V. 10. № 2. P. 149–152.
42. Pulkkinen K., Luomala M., Kuusisto H., Lehtimaki T., Saarela M., Jalonen T.O., Elovaara I. // *Acta Neurol. Scand.* 2004. V. 109. № 5. P. 342–347.
43. Malferrari G., Stella A., Monferini E., Saltini G., Proverbio M.C., Grimaldi L.M., Rossi-Bernardi L., Biunno I. // *Exp. Mol. Pathol.* 2005. V. 78. № 1. P. 55–57.
44. Rasmussen H.B., Kelly M.A., Francis D.A., Clausen J. // *J. Neurol. Sci.* 2001. V. 184. № 2. P. 143–147.
45. Fukazawa T., Yanagawa T., Kikuchi S., Yabe I., Sasaki H., Hamada T., Miyasaka K., Gomi K., Tashiro K. // *J. Neurol. Sci.* 1999. V. 171. № 1. P. 49–55.
46. Arthur A.T., Armati P.J., Bye C., Heard R.N., Stewart G.J., Pollard J.D., Booth D.R. // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 9. P. 17.
47. Weinschenker B.G., Hebrink D., Kantarci O.H., Schaefer-Klein J., Atkinson E., Schaid D., McMurray C.M. // *J. Neuroimmunol.* 2001. V. 120. № 1–2. P. 138–145.
48. Green A.J., Barcellos L.F., Rimmler J.B., Garcia M.E., Caillier S., Lincoln R.R., Bucher P., Pericak-Vance M.A., Haines J.L., Hauser S.L., Oksenberg J.R. // *J. Neuroimmunol.* 2001. V. 116. № 1. P. 116–124.
49. Zivkovic M., Djuric T., Dincic E., Raicevic R., Alavantic D., Stankovic A. // *J. Neuroimmunol.* 2007. V. 189. № 1–2. P. 147–150.
50. Benesova Y., Vasku A., Stourac P., Hladikova M., Beranek M., Kadanka Z., Novotna H., Bednarik J. // *J. Neuroimmunol.* 2008. V. 205. № 1–2. P. 105–109.
51. Mirowska-Guzel D., Gromadzka G., Czlonkowski A., Czlonkowska A. // *J. Neuroimmunol.* 2009. V. 214. № 1–2. P. 113–117.
52. Akkad D.A., Arning L., Ibrahim S.M., Epplen J.T. // *Genes Immun.* 2007. V. 8. № 8. P. 703–706.
53. Urcelay E., Santiago J.L., Mas A., Martinez A., de Las Heras V., Arroyo R., de la Concha E.G. // *J. Neuroimmunol.* 2005. V. 168. № 1–2. P. 164–167.
54. Kamali-Sarvestani E., Nikseresht A., Aflaki E., Sarvari J., Gharesi-Fard B. // *Acta Neurol. Scand.* 2007. V. 115. № 3. P. 161–166.
55. Gade-Andavolu R., Comings D.E., MacMurray J., Vuthoori R.K., Tourtellotte W.W., Nagra R.M., Cone L.A. // *Mult. Scler.* 2004. V. 10. № 5. P. 536–539.