

УДК 575.22:340.6

Снижение риска инфицирования ВИЧ и летальности у гетерозигот по делеционному аллелю *CCR5del32* гена хемокинового рецептора: исследование случая фокусной нозокомиальной ВИЧ-инфекции и мета-анализ

С. А. Боринская¹, Ж. М. Кожекбаева^{1#}, А. В. Залесов^{1,2}, Е. В. Ользеева³, А. Р. Максимов⁴, С. И. Куцев^{5##}, М. М. Гараев⁶, А. В. Рубанович¹, Н. К. Янковский^{1,2,7*}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

²Московский физико-технический институт, 141700, Московская область, Долгопрудный, Институтский пер., 9

³Министерство здравоохранения и социального развития Республики Калмыкия, 358000, Элиста, ул. Н. Очирова, 6

⁴ГУ «Центр крови Республики Калмыкия», 358000, Элиста, ул. Пушкина, 52

⁵Ростовский государственный медицинский университет, 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29

⁶НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 16

⁷Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

В настоящее время Университет Майами, Флорида, США.

В настоящее время Российский национальный исследовательский медицинский университет, Москва.

*E-mail: yankovsky@vigg.ru

Поступила в редакцию 17.10.2011 г.

РЕФЕРАТ Делеционный аллель *CCR5del32* гена хемокинового рецептора **R5** в гомозиготном состоянии почти полностью предотвращает инфицирование его носителей вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Однако данные о влиянии гетерозиготного носительства этого аллеля на риск инфицирования противоречивы. Мы исследовали влияние гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* на риск инфицирования, сравнивая частоты этого аллеля в группе детей (27 калмыков, 50 русских) с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией (G-подтип ВИЧ-1) и в популяционных контрольных группах. В группе ВИЧ-инфицированных частота аллеля *CCR5del32* оказалась ниже, чем в контрольной группе, но полученные различия были незначимыми. Аналогичные результаты приведены и в ряде ранее опубликованных статей. Незначимость различий может быть обусловлена либо случайным варьированием частот аллеля в отсутствие протективного эффекта, тогда при увеличении размера выборки различия частот останутся незначимыми, либо недостаточным размером выборки при наличии протективного эффекта. Поэтому, чтобы различить эти две возможности, мы провели мета-анализ опубликованных результатов 25 исследований (всего 5963 ВИЧ-инфицированных и 5048 индивидов в контрольных группах), включая наши собственные экспериментальные данные. Анализ показал, что аллель *CCR5del32* в гетерозиготном состоянии препятствует инфицированию его носителей ВИЧ-1 ($OR = 1.22$, $CI_{95\%} = 1.10-1.36$). Риск инфицирования гетерозигот *CCR5wt/del32* не менее чем на 13% ниже по сравнению с гомозиготами *CCR5wt/wt*. Подобные оценки для европеоидных групп получены впервые. В исследованной нами группе уровень смертности у гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32* через 15 лет после инфицирования был на 40.9% ниже, чем в группе лиц, не имеющих этого аллеля. Размер изученной выборки был небольшим, а различия в уровне смертности в зависимости от генотипа по полиморфизму *CCR5del32* статистически незначимыми ($OR = 2.0$; $p = 0.705$), однако полученные нами

оценки качественно и количественно совпадают с ранее опубликованными данными. Обсуждаются особенности проведения мета-анализа, влияющие на пороговую величину выявляемых эффектов и их статистическую значимость. Оценено влияние частот аллеля *CCR5del32* на межэтнические различия в инфицируемости ВИЧ и смертности от СПИДа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-инфекция, нозокомиальная инфекция, риск смерти, риск инфицирования, ген хемокинового рецептора, аллель *CCR5del32*, мета-анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемия СПИДа, начавшаяся с зарегистрированных в 1981 г. единичных случаев, в настоящее время представляет одну из важнейших проблем здравоохранения как в России, так и во всем мире [1]. Развитие эпидемического процесса в России характеризуется формированием нозокомиальных очагов инфекции в 1988–1989 гг. Вспышка инфекции началась с госпитализированного в детскую больницу г. Элисты ВИЧ-инфицированного ребенка и в результате несоблюдения противоэпидемических мероприятий распространилась в больницах Калмыкии, Ростовской, Волгоградской областей и Ставропольского края. Всего из одного источника (фокусная инфекция) было инфицировано более 260 детей и их матерей [2, 3], многие из которых к настоящему времени умерли (рис. 1).

У части ВИЧ-инфицированных наблюдается быстрое, за 2–3 года, развитие заболевания и появление симптомов СПИДа, тогда как у других носителей ВИЧ симптомы не проявляются на протяжении долгого времени. Различия в скорости прогрессии заболевания могут быть обусловлены как внешними факторами (условия инфицирования, сопутствующие заболевания, проводимое лечение), так и индивидуальными генетическими особенностями больного [4].

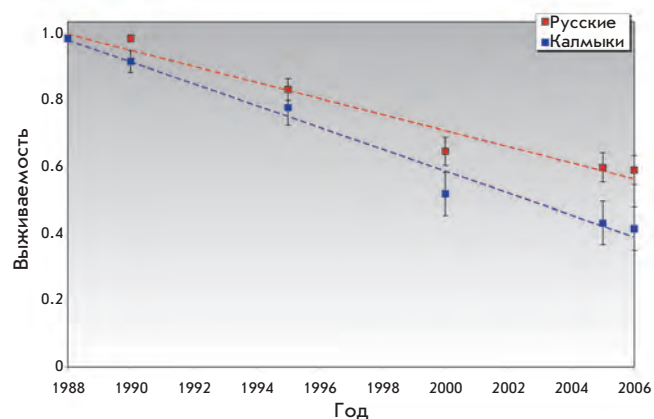


Рис. 1. Динамика выживаемости лиц с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией – русских (Ростов-на-Дону – 107, Элиста – 13 человек) и калмыков (Элиста – 57 человек).

Среди генов человека, влияющих на ход развития ВИЧ-инфекции, наибольшее значение имеет ген *CCR5*, кодирующий СС-хемокиновый рецептор 5, опосредующий связывание ВИЧ с клеточной мембраной и проникновение определенных штаммов вируса в клетку [4]. Делеция 32 п.н. в гене *CCR5*, обозначаемая *CCR5del32* (rs333), приводит к синтезу нефункционального белка. У носителей делеции в гомозиготном состоянии функциональные рецепторы *CCR5* отсутствуют, а в случае гетерозиготного носительства их количество снижено.

Делеционный аллель *CCR5del32* встречается преимущественно в популяциях европейского происхождения. Частота его наиболее высока в странах Северной Европы (до 15–18%), тогда как в большинстве азиатских популяций частота этого аллеля не превышает 3–5%. В популяциях африканского происхождения и у коренного населения Америки и Океании этот аллель практически отсутствует [5–7].

Индивиды, гомозиготные по *CCR5del32*, доля которых в европейских популяциях составляет 1–2%, обладают высокой, но не абсолютной устойчивостью к инфицированию. Среди ВИЧ-инфицированных гомозиготные носители *CCR5del32* встречаются очень редко – описано всего 12 таких случаев из более 20 000 обследованных, и у большинства из них вирус обладал тропизмом к рецептору CXCR4, но не к *CCR5* [8–13]. Протективный эффект гомозиготности по аллелю *CCR5del32* подтвержден как в ряде эпидемиологических исследований (повышенная частота гомозигот среди ВИЧ-негативных индивидов, подвергавшихся риску инфицирования), так и при инфицировании *in vitro* клеток CD4⁺, полученных от индивидов с различными генотипами [14].

Протективный эффект гетерозиготного носительства *CCR5del32* проявлялся и в развитии симптомов СПИДа у ВИЧ-инфицированных. Не исключено, что возможность бессимптомного недиагностированного носительства ВИЧ гетерозиготами *CCR5del32*/+ может способствовать распространению инфекции. У ВИЧ-инфицированных гетерозиготных носителей *CCR5del32* вирусная нагрузка ниже, медленнее падает количество CD4⁺ Т-клеток, и симптомы СПИДа развиваются медленнее как у взрослых [8, 11, 13–17], так и у детей (большая часть которых ин-

фицирована перинатально) [18]. Частота гетерозиготных носителей *CCR5del32* значительно выше в группе лиц, инфицированных в 1980-х гг. и проживших более 10 лет после инфицирования [11].

Однако данные о том, что гетерозиготное носительство аллеля *CCR5del32* защищает от инфицирования ВИЧ, остаются противоречивыми. Так, в ряде работ частота гетерозигот среди инфицированных была ниже, чем среди неинфицированных, подвергавшихся риску инфицирования, или в общей выборке из той же популяции, что может указывать на частичную резистентность индивидов с генотипом *CCR5wt/del32* к ВИЧ-1 [10, 12]. В других исследованиях такой эффект обнаружен не был – различия в частотах гетерозигот *CCR5wt/del32* и/или аллеля *del32* между группами ВИЧ-позитивных и ВИЧ-негативных индивидов либо отсутствовали, либо были статистически незначимыми [8, 19–21]. В представленной работе мы проанализировали влияние гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* на выживаемость детей с фокусной нозокомиальной ВИЧ-инфекцией и риск инфицирования при инъекционном пути заражения, а также провели мета-анализ опубликованных данных с целью оценки возможного снижения риска инфицирования у гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом послужили образцы крови из коллекции лаборатории биотехнологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, собранные в различные периоды между 1991 и 2007 гг. во время плановых медицинских обследований лиц с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией. Получено согласие родителей обследованных детей на использование части образцов для научных исследований. Уникальность этой выборки ВИЧ-инфицированных заключается в том, что в ней отсутствует вариабельность в развитии инфекции, связанная с различиями штаммов вируса – все были инфицированы одним и тем же штаммом вируса (G-подтип ВИЧ-1), источником которого послужил единственный больной ребенок (фокусная нозокомиальная инфекция) [22, 23]. Кроме того, большинство больных принадлежали к двум этническим группам (русские и калмыки), что снижает возможное влияние генетической гетерогенности в каждой из когорт. Анонимные данные о дате рождения пациентов и смерти в случае летальных исходов получены для 107 ВИЧ-инфицированных Ростовской обл. (все русские) и 60 ВИЧ-инфицированных из г. Элисты (47 калмыков и 13 русских). Для исследования были доступны образцы крови ВИЧ-инфицированных детей – 50 русских и 27 калмыков (возраст детей – от менее 1 года до 16 лет, в среднем 2.7 года). Контролем служили образцы крови здоровых доноров.

Первую группу составили студенты медицинского университета г. Ростова-на-Дону (большинство 1986–1990 года рождения), по данным опроса русские в двух поколениях, родившиеся в Ростовской обл. Вторую контрольную группу составили калмыки, проживающие в г. Элисте (этническую принадлежность устанавливали по данным опроса). Образцы крови собирали с соблюдением процедуры информированного согласия. Проект генетического исследования одобрен Этической комиссией ИОГен РАН.

Геномную ДНК выделяли из образцов венозной крови (объем до 50 мкл) с помощью коммерческого набора DNAprep («Изоген», Москва) в соответствии с инструкцией производителя, в лаборатории биотехнологии НИИ вирусологии РАМН, оборудованной для работы с инфицированными образцами.

Генотипирование проводили с помощью ПЦР-амплификации образцов ДНК. Праймеры и условия амплификации описаны ранее [24]. Продукты ПЦР-амплификации подвергали электрофорезу в 2% агарозном геле для определения размера фрагментов.

Оценка величины протективного эффекта аллеля *CCR5del32* в гетерозиготном состоянии

Во всех выборках наблюдаемые эффекты единообразно характеризовали величиной отношения шансов (OR), которую рассчитывали как отношение шансов носительства генотипа *wt/wt* у ВИЧ-положительных и ВИЧ-отрицательных индивидов:

$$OR = \frac{P(wt/wt | ВИЧ+)}{1 - P(wt/wt | ВИЧ+)} / \frac{P(wt/wt | ВИЧ-)}{1 - P(wt/wt | ВИЧ-)} = \frac{P(wt/wt | ВИЧ+)P(wt/del | ВИЧ-)}{P(wt/del | ВИЧ+)P(wt/wt | ВИЧ-)},$$

где $P(* | ВИЧ+)$ и $P(* | ВИЧ-)$ – частоты генотипов в выборках инфицированных и здоровых соответственно. Отношение рисков (RR), которое определяется как отношение заболеваемости при различных генотипах, оценивали по формуле:

$$RR = \frac{P(ВИЧ+ | wt/wt)}{P(ВИЧ+ | wt/del)} = \frac{Se}{1 - Se} \cdot \frac{1 - P(wt/wt)}{P(wt/wt)},$$

где Se – чувствительность тестирования на предрасположенность, т.е. частота рисков генотипа *wt/wt* у больных, и $P(wt/wt)$ – популяционная частота рисков генотипа.

Статистическую значимость частотных различий оценивали с использованием двустороннего точного критерия Фишера.

Таблица 1. Распределение частот генотипов и аллелей по гену *CCR5* у ВИЧ-инфицированных детей и в контрольных выборках

Группа	N	Число индивидов (частоты генотипов, %)			Частота аллелей и стат. ошибка (\pm SE)		Сравнение ВИЧ+ и контрольной группы
		<i>wt/wt</i>	<i>wt/del</i>	<i>del/del</i>	<i>wt</i>	<i>del</i>	
ВИЧ, дети калмыки	27	27	0	0	1	0	OR = 2.85 p=0.558
Контроль, калмыки Элисты	70	67 (95.71)	3 (4.28)	0	0.979 \pm 0.012	0.021 \pm 0.012	
ВИЧ, русские дети	50	39 (78.0)	11 (22.0)	0	0.890 \pm 0.031	0.110 \pm 0.031	OR = 1.21 p = 0.690
Контроль, русские Ростовской обл.	99	73 (73.7)	25 (25.3)	1 (1.0)	0.864 \pm 0.024	0.136 \pm 0.024	

Таблица 2. Частоты аллеля *CCR5del32* (rs333) в группах русских и у калмыков

Популяция	N	Частота аллеля <i>CCR5del32</i>	CI _{95%}	Источник
Русские: Ленинградск. обл	33	0.166	0.083–0.300	[27]
Кострома	54	0.157	0.091–0.252	[28]
СПб.	50	0.130	0.069–0.223	[29]
Москва	83	0.139	0.088–0.208	[30]
Москва	176	0.122	0.088–0.164	[31]
Рязань	78	0.12	0.072–0.188	[32]
Липецк	48	0.104	0.045–0.192	[Гараев М.М., собственные данные]
Новосибирск	53	0.104	0.051–0.187	[33]
г. Лысьва	186	0.100	0.070–0.138	[34]
Москва, без указания национальности	171	0.091	0.062–0.129	[35]
Ростов-на-Дону	99	0.136	0.089–0.198	Данная работа
Русские дети, ВИЧ	50	0.110	0.054–0.198	–“–
Калмыки	70	0.021	0.004–0.063	–“–
Калмыки дети, ВИЧ	27	0	0–0.073	–“–

Мета-анализ проводили с использованием свободно распространяемой компьютерной программы для эпидемиологов WinPeri v. 10 (2010) [25]. Программа позволяет оценить среднее значение OR согласно модели с фиксированными эффектами (оценка Мантеля–Хензеля) и модели со случайными эффектами (оценка по DerSimonian-Laird). Выбор между моделями производится на основе анализа гетерогенности совокупности данных (Q-тест Кохрена).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Частота аллелей и генотипов у ВИЧ-инфицированных и в контрольных группах

У каждого ребенка из выборки детей с нозокомиальной ВИЧ-инфекцией и у индивидов из контрольных групп были определены генотипы по гену *CCR5* и выявлены носители аллеля *CCR5del32* (табл. 1). Рас-

пределение генотипов во всех группах не отличалось значимо от равновесного по Харди–Вайнбергу.

Частота аллеля *CCR5del32*, в популяции калмыков установленная впервые, составила 0.021 ± 0.012 . Такая низкая частота этого аллеля в популяции калмыков соответствует его частоте в соседствующих популяциях Кавказа (3–5%) и низкой частоте в популяциях Центральной Азии, родственных калмыкам по происхождению (например, 1.1% у монголов Китая [26]). В выборке из 27 ВИЧ-инфицированных детей калмыков носители этого аллеля не выявлены (отличия от частоты в контрольной группе незначимы: $p = 0.558$ по точному тесту Фишера).

У русских, согласно опубликованным данным, в различных географических группах частота аллеля *CCR5del32* варьирует от 0.104 до 0.157 (табл. 2) (см. обзор [7]). Так как большинство инфицированных русских детей в исследованной нами выборке

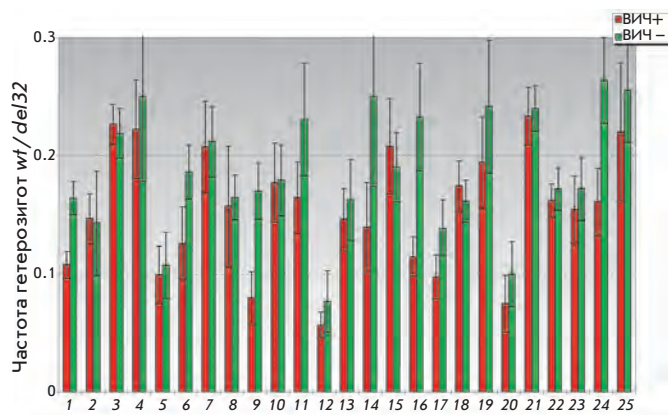


Рис. 2. Частоты гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* среди ВИЧ-инфицированных (ВИЧ+) и здоровых лиц (ВИЧ-). 1 – бельгийцы и французы [10]; 2 – швейцарцы (ВИЧ-инфицированные [36], контроль [37]); 3 – евроамериканцы [38]; 4 – датчане [39]; 5 – итальянцы, Милан [40]; 6 – австралийцы [41]; 7 – финны [42]; 8 – словенцы [43]; 9 – испанцы, Астурия [44]; 10 – жители Москвы [19]; 11 – русские (ВИЧ-инфицированные – москвичи, контроль – русские, Рязань) [20]; 12 – испанцы, Южная Испания [45]; 13 – испанцы [46]; 14 – венгры [47]; 15 – русские, Пермский край [34]; 16 – евроамериканки [48]; 17 – немцы, Мюнхен [49]; 18 – евроамериканцы, Сиэтл [50]; 19 – поляки [51]; 20 – итальянцы [52]; 21 – эстонцы [21]; 22 – немцы [13]; 23 – словаки [53]; 24 – поляки, Щецин [54]; 25 – русские, Ростовская обл. (данная работа).

находились в больницах Ростова-на-Дону, а частота аллеля *CCR5del32* у русских Ростовской обл. не была известна, контрольную группу сформировали из добровольцев – студентов медицинского института Ростова-на-Дону, русских в двух поколениях (согласно данным опроса), родившихся в Ростовской обл. Частота аллеля *CCR5del32* в этой группе составила 0.136 ± 0.024 , что находится в пределах диапазона вариабельности частот в различных географических группах русских. У ВИЧ-инфицированных русских детей частота аллеля *CCR5del32* оказалась несколько ниже (0.110 ± 0.031), однако различия не достигали значимого уровня ($OR = 1.21, p = 0.69$).

При столь небольшом размере выборок более низкая частота аллеля *CCR5del32* у ВИЧ-инфицированных по сравнению с контролем может быть как случайным эффектом, так и результатом протективного действия этого аллеля.

В ряде работ получены данные о более низкой частоте аллеля *CCR5del32* и/или более низкой частоте гетерозигот *wt/del32* среди ВИЧ-инфицированных по сравнению с популяционным контролем, причем во многих случаях эти различия также не достигают

значимого уровня, тогда как в других исследованиях выявлено обратное соотношение частот (рис. 2 и база данных частот аллелей (лаборатория анализа генома ИОГен РАН) <http://vigg.ru/institute/podrazdelenija/otdel-genomiki-i-genetiki-cheloveka/laboratorija-analiza-genoma/allefdb/ccr5-hiv/>). Для оценки возможного протективного эффекта гетерозиготности по *CCR5del32* мы провели мета-анализ опубликованных данных по частоте гетерозигот *CCR5wt/del32* среди ВИЧ-инфицированных и в контрольных группах.

Мета-анализ: снижает ли гетерозиготность по *CCR5del32* риск инфицирования?

Для проведения мета-анализа из более чем 360 статей, выявляемых в PubMed по запросу «*CCR5 AND deletion AND HIV*» (сентябрь 2011 г.), отобрали статьи, в которых сравниваются частоты аллелей и генотипов в выборках ВИЧ-инфицированных и в соответствующих контрольных выборках неинфицированных индивидов. Публикации, в которых изучали азиатские, африканские и латиноамериканские популяции с частотой аллеля *CCR5del32* 1–3% или ниже, из анализа исключали.

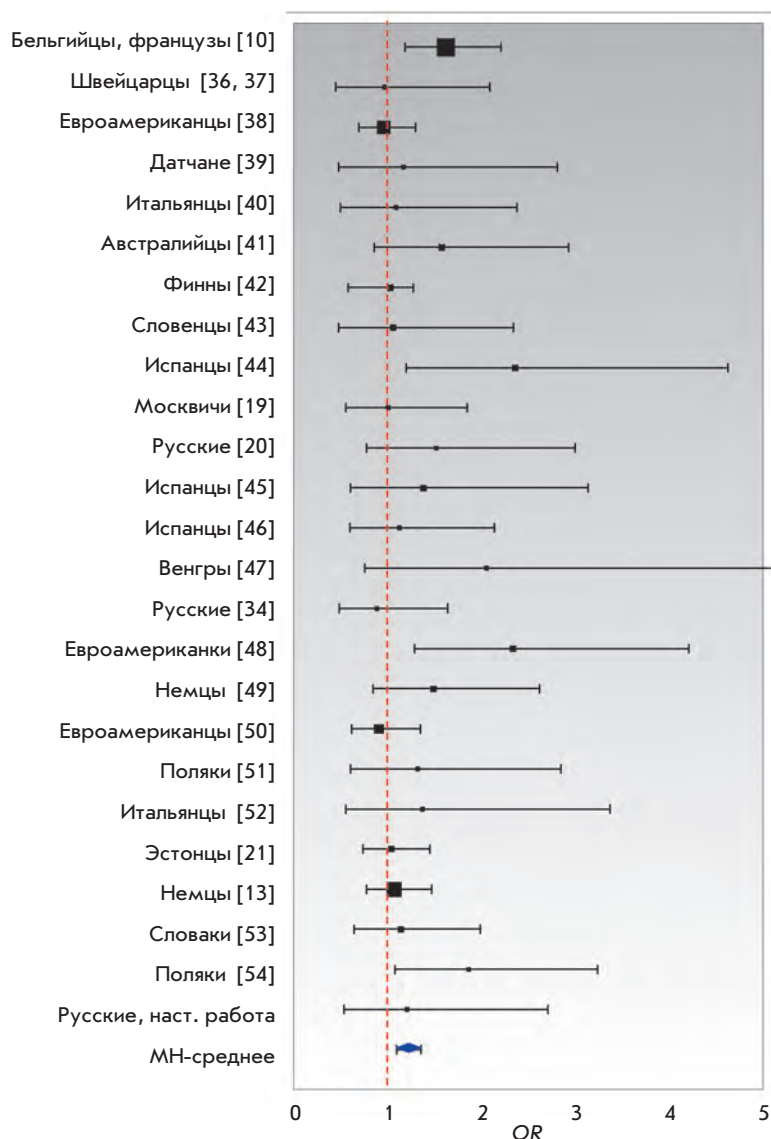
Из-за различий частот аллеля *CCR5del32* в популяциях европейского происхождения (от 5–8% на юге Европы до 15–18% на севере) [7] необходимо, чтобы этническая принадлежность индивидов контрольных групп (а в некоторых случаях и подгрупп внутри этнической группы) строго соответствовала принадлежности группы инфицированных. Поэтому публикации, в которых этническая принадлежность групп не указана или выборки не были этнически гомогенными, также исключили. В итоге для мета-анализа отобрали 25 групп европеоидов, включая нашу выборку, – всего 5967 ВИЧ-инфицированных и 5410 индивидов в контрольных группах (табл. 3).

Частота гомозиготных носителей делеции составила 4 из 5967 среди ВИЧ-инфицированных против 63 из 5410 в контроле. Такое соотношение соответствует $OR = 17.6$ при $p = 4.4 \times 10^{-16}$. В данном случае величина относительного риска приблизительно

Таблица 3. Уровень смертности к 2006 г. в исследованных выборках в зависимости от генотипа

Генотип	Русские	Калмыки
<i>wt/wt</i>	12 из 39 (30.8%)	11 из 27 (40.7%)
<i>wt/del32</i>	2 из 11 (18.2%)	–
Всего	14 из 50 (28.0%)	11 из 27 (40.7%)

Рис. 3. Оценки отношений шансов (*OR*) и соответствующие 95% доверительные интервалы для 25 выборок европеоидов (перечислены в подписи к рис. 2). Вертикальная пунктирная линия соответствует $OR = 1$ (отсутствие эффектов). Точки справа от этой прямой указывают на протективный эффект генотипа *wt/CCR5del32*. Размеры маркеров-квадратиков условно пропорциональны объемам выборок. Нижний маркер-ромб соответствует усредненной оценке *OR* по Мантелю–Хензелю (МН-среднее).



равна величине *OR*, т.е. вероятность инфицирования гомозиготных по делеции лиц в 17.6 раза меньше, чем носителей остальных генотипов. Близкие оценки протективного эффекта гомозиготного носительства делеции получены в отдельных исследованиях евроамериканцев при сравнении групп серонегативных индивидов, подвергавшихся риску инфицирования, с серопозитивными и популяционным контролем [9, 38] и в других исследованиях [10, 11]. Поэтому гомозиготы *CCR5del32/CCR5del32* были исключены из дальнейшего анализа, и для оценки риска инфицирования рассматривали соотношение гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32* и индивидов, у которых этот аллель отсутствовал, т.е. соотношение генотипов *wt/CCR5del32* и *wt/wt* в группах ВИЧ-инфицированных и в популяционном контроле.

Сравнение частот генотипов показало, что только в 4 из 25 исследований, вошедших в мета-анализ, частота гетерозигот *wt/CCR5del32* у ВИЧ-инфицированных была выше, чем у здоровых лиц (рис. 2). При предположении о случайности эффекта вероятность события «из 25 работ не более чем в четырех частота гетерозигот у больных выше, чем у здоровых» и равна 4.7×10^{-7} (аналогично вероятности выпадения не более четырех «орлов» в 25 бросаниях монеты).

Для каждой выборки вычислено отношение шансов (*OR*) и проведено их усреднение с учетом численности выборок и степени однородности эффектов. Результаты представлены в графической форме (рис. 3).

Проведенный по результатам 25 исследований мета-анализ обнаружил, что частота гетеро-

зигот *wt/CCR5del32* по отношению к гомозиготам *wt/wt* в выборках ВИЧ-инфицированных достоверно ниже, чем в контроле ($p = 0.0002$ по двустороннему точному тесту Фишера и $p = 0.00018$ по тесту χ^2). По Q-тесту Кохрена гетерогенность данных незначима: $\chi^2 = 25.29$, $p = 0.39$. Доля изменчивости, обусловленная гетерогенностью значений *OR*, равна $I^2 = 5.1\%$ ($CI_{95\%} = 0-36.4\%$). Эта величина существенно меньше критического значения (50%), что позволяет принять «модель с фиксированными эффектами», а для усреднения значений *OR* использовать формулу Мантеля-Хензеля (МН-среднее). Итоговое значение эффекта достаточно низкое – $OR = 1.22$, $CI_{95\%} = 1.10-1.36$. Однако эти оценки имеют большой запас устойчивости: необходимо добавить 28 исследований, в которых частоты генотипов не различались бы между выборками больных и в контроле ($OR = 1$), чтобы итоговое значение эффекта снизилось до незначимого уровня $OR = 1.1$.

При проведении мета-анализа принято рассматривать возможность искажения представленности данных в публикациях (publication bias). Это связано с тем, что и авторы работ и редакции журналов охотнее публикуют положительные результаты, чем отрицательные или «нулевые». Кроме того, слишком часто публикуются работы с большими эффектами, полученными на малых выборках. Все это может привести к завышению оценки усредненного значения эффекта при мета-анализе (рис. 4А). Стандартный метод проверки симметричности данных состоит

в построении зависимости величины эффекта (*OR*) от объема выборки (funnel-plot – «график-воронка»). Сильная асимметрия этого графика может указывать на избирательную представленность данных в публикациях. В нашем случае асимметрия незначима (рис. 4Б): ранговая корреляция Кендалла между *OR* и объемом выборки равна 0.21 при $p = 0.187$; асимметрия по регрессионному тесту [55] недостоверна ($p = 0.148$).

Таким образом при мета-анализе, в который вошли и наши собственные экспериментальные данные, выявлен статистически значимый, хотя и слабый протективный эффект гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* в отношении инфицирования ВИЧ: $OR = 1.22$ при $p = 2 \times 10^{-4}$. Достаточно низкое значение *OR* объясняет, почему в большинстве статей не обнаружены значимые различия в частоте гетерозигот по данному аллелю (и частот аллеля) между ВИЧ-инфицированными и контрольными группами. Вычисления показывают, что при частоте делеционного аллеля, равной 10%, и $OR = 1.22$ значимый эффект ($p = 0.05$ при мощности 80%) может быть обнаружен лишь при общем объеме выборки 4500 (2250 больных и 2250 здоровых).

Полученная оценка $OR = 1.22$ не означает, что риск инфицирования у носителей генотипа *wt/wt* на 22% выше, чем у гетерозиготных носителей аллеля *CCR5del32*. *OR* – это отношение шансов, но не рисков инфицирования. Отношение рисков (*RR*), которое определяется как отношение заболеваемости

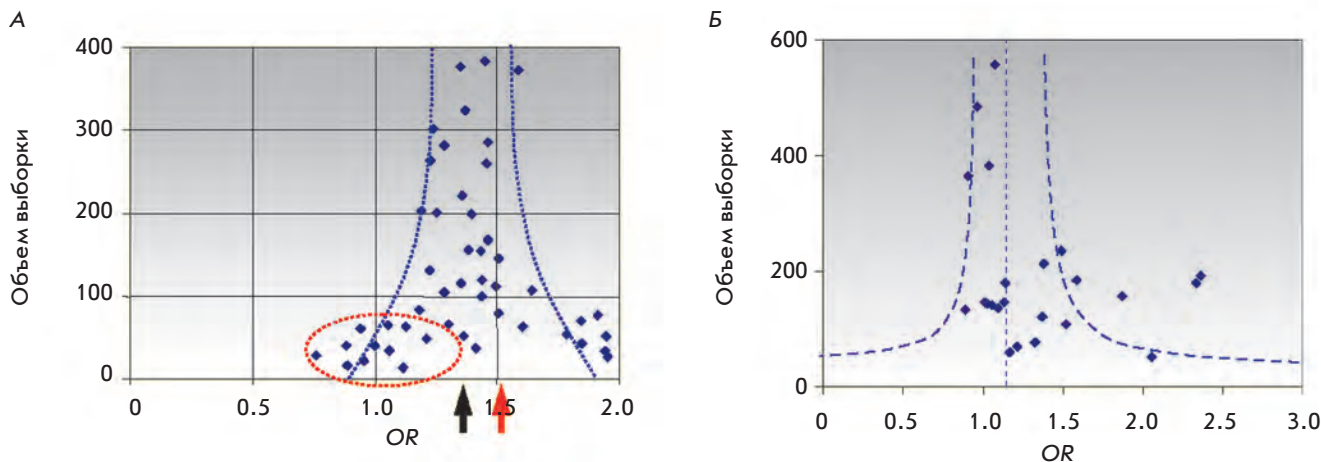


Рис. 4. Зависимость величины эффекта (*OR*) от состава выборок, вошедших в мета-анализ (funnel-plot – «график-воронка»). Сильная асимметрия этого графика может указывать на избирательную представленность данных в публикациях (publication bias). А – Гипотетическое распределение исследований по размеру изученных выборок и силе эффекта. При исключении менее охотно публикуемых результатов, полученных на малых выборках со слабыми эффектами (точки в пунктирном овале), значение *OR* оказывается завышенным (красная стрелка) относительно «реального» (черная стрелка). Б – Распределение исследований по размеру выборок и силе эффекта для 25 публикаций, включенных в мета-анализ в данной работе (асимметрия незначима).

при различных генотипах, невозможно непосредственно оценить в ассоциативных исследованиях типа «случай–контроль». Можно лишь предложить различные косвенные оценки RR на основе значений OR и популяционных частот аллелей, либо данных по заболеваемости [56]. Кроме того, всегда выполняется неравенство: $OR \geq RR$. По результатам настоящего мета-анализа соответствующие оценки равны: $SE = 0.851$ и $P(wt/wt) = 0.835$, откуда $RR = 0.13$. Таким образом, у гомозигот wt/wt вероятность инфицирования как минимум на 13% выше, чем у носителей аллеля $CCR5del32$.

Наша оценка основана на сравнении соотношения частот генотипов $wt/CCR5del32$ и wt/wt у ВИЧ-инфицированных и в популяционном контроле. При этом очевидно, что ВИЧ-инфицированные контактировали с вирусом и были инфицированы, а в популяционном контроле индивиды с вирусом не контактировали (доля контактировавших и/или ВИЧ-инфицированных предполагается пренебрежимо малой в исследованных популяциях европейского происхождения). Более точно оценить протективный эффект гетерозиготности можно при использовании контрольной группы из индивидов, контактировавших с вирусом, но оставшихся ВИЧ-негативными. Однако в существующих группах высокого риска (больные гемофилией; половые партнеры ВИЧ-инфицированных; потребители инъекционных наркотиков; мужчины, практикующие незащищенные рецептивные анальные половые контакты с мужчинами (MSM); лица, занимающиеся проституцией) доля индивидов, контактировавших с вирусом, сильно различается и не всегда может быть установлена. При проведении мета-анализа результатов таких исследований можно использовать модель со случайными эффектами. Однако из-за гетерогенности выборок оценки OR в различных исследованиях в значительной мере отражают не собственно протективный эффект аллеля в группе контактировавших с вирусом, а вероятность контакта с вирусом в различных группах риска.

Этот феномен можно проиллюстрировать, сравнивая частоты гомозигот по делеционному аллелю среди неинфицированных индивидов в двух группах риска – больных гемофилией [57] и мужчин MSM [38]. У неинфицированных индивидов в группе MSM частота гомозигот $CCR5del32/del32$ составила 4.5% (5 из 111 человек), а среди неинфицированных больных гемофилией – 16.3% (7 из 43 человек), при том, что популяционная частота таких гомозигот в европейских популяциях не превышает 1–2%. Различия в частотах гомозиготных носителей делеции в двух группах риска статистически значимы ($p = 0.038$, двусторонний тест Фишера). Более высокая частота

гомозигот $CCR5del32/del32$ среди больных гемофилией объясняется более высоким риском заражения – у получавших интенсивное лечение препаратами крови в 1978–1985 гг. он составлял 94% [57]. Так как почти 100% больных, получавших препараты крови, контактировали с вирусом, можно полагать, что более высокая частота гомозигот по делеционному аллелю, т.е. более выраженный протективный эффект, не может быть достигнут из-за генетической гетерогенности признака устойчивости к заражению макрофаготропными штаммами ВИЧ [58], подобно тому, как в природных условиях в одной и той же популяции происходит отбор протективных аллелей различных генов, обеспечивающих устойчивость к инфекции (например, к малярии).

Влияние гетерозиготности по аллелю $CCR5del32$ на уровень выживаемости ВИЧ-инфицированных индивидов

Внутри обеих выборок (русских и калмыков) ранее наблюдали вариабельность в скорости перехода ВИЧ-инфекции к СПИДу и в уровне летальности, связанную с факторами негенетической природы (возрастом инфицирования, который составляет в этих выборках от нескольких месяцев до 14 лет, в среднем 2.5 года), интенсивностью парентеральных вмешательств, сопутствующими заболеваниями [3].

К 2006 г. уровень смертности в исследованной нами выборке составил 32.5% (25 из 77 человек). Среди инфицированных русских детей смертность составила 28.0% (14 из 50), среди детей-калмыков – 40.7% (11 из 27). Уровень смертности русских в изученной группе к 2006 г. был на 31.2% ниже, чем у калмыков, однако при данных объемах выборок эти различия не были значимыми ($p = 0.311$). Тем не менее регрессии, описывающие динамику смертности в целом, значимо отличаются: угловой коэффициент наклона регрессии для русских детей составляет -0.016 ± 0.004 против -0.025 ± 0.002 для детей-калмыков ($p = 0.02$, двусторонний Z-тест). Для совокупности данных, приведенных на рис. 1, соответствующие оценки равны: -0.025 ± 0.002 у русских против -0.033 ± 0.002 у калмыков ($p = 0.005$, двусторонний Z-тест).

Мы проверили, влияет ли носительство аллеля $CCR5del32$ на выживаемость инфицированных и могут ли различия в продолжительности жизни после инфицирования в двух этнических группах быть связаны с различием в частоте $CCR5del32$.

В исследованной нами выборке у ВИЧ-инфицированных детей-калмыков делеционный аллель не выявлен – все они имели генотип wt/wt . Среди инфицированных русских детей с генотипом wt/wt уровень смертности составил

30.8% (12 из 39), тогда как среди носителей аллеля *CCR5del32* – 18.2% (2 из 11) (табл. 3). Таким образом, уровень смертности русских детей с генотипом *wt/CCR5del32* через 15 лет после инфицирования на 40.9% ниже, чем у детей без делеционного аллеля, однако эти различия статистически незначимы ($OR = 2.0$; $p = 0.705$). Ограниченный размер выборок не позволяет принять или опровергнуть гипотезу о том, что различия в продолжительности жизни в двух этнических группах связаны с различием в частотах аллеля *CCR5del32*. Тем не менее следует отметить буквальное совпадение полученных нами незначимых оценок с опубликованными ранее данными. Согласно результатам мета-анализа 19 когорт ВИЧ-инфицированных (всего 1635 европеоидов), протективный эффект гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* проявляется 39-процентным снижением риска смерти [17]. При таком уровне эффекта ($OR = 2$) для достижения статистической значимости размер выборки инфицированных должен составлять не менее 550 человек при смертности 30% и 400 человек в момент, когда смертность достигает 60%.

Например, в исследовании 507 ВИЧ-инфицированных поляков, наблюдавшихся в течение 15 лет в период до внедрения антиретровирусной терапии, различия в уровне смертности между носителями генотипов *wt/del32* и *wt/wt* составили 49% (при общей смертности 19%), и эти различия были статистически значимыми ($p = 0.026$), тогда как у лиц, получавших лечение (442 индивида), такие различия были незначимыми ($p = 0.23$) [59].

ОБСУЖДЕНИЕ

На основе мета-анализа опубликованных данных нами впервые оценено влияние гетерозиготного носительства делеционного аллеля *CCR5del32* на риск ВИЧ-инфицирования в популяциях европейского происхождения (без учета пути заражения, серотипа вируса и различий в проведении антиретровирусной терапии). Выявленный нами протективный эффект невелик ($OR = 1.22$), но статистически значим, и соответствует, согласно расчетам, не менее чем 13-процентному снижению риска инфицирования у носителей генотипа *CCR5wt/del32*. Небольшая величина OR объясняет, почему в большинстве статей обнаруживаемые различия в частотах генотипов и/или аллеля *CCR5del32* между группами ВИЧ-инфицированных и популяционным контролем статистически незначимы.

Демонстрация достоверности данного феномена требует исследования выборок тем большего размера, чем ниже частота встречаемости аллеля в популяции. В частности, в популяциях Китая, где частота

встречаемости аллеля *CCR5del32* ниже, чем у европейцев, мета-анализ (14 исследований, 1607 инфицированных и 1632 индивида в контрольных группах) не обнаружил значимого протективного эффекта гетерозиготного носительства *wt/del32*: $OR = 1.156$ ($CI_{95\%} = 0.808-1.654$) [60].

Аллель *CCR5del32* встречается преимущественно в популяциях европейского происхождения, при этом частота его в популяциях юга Европы (у испанцев, итальянцев, греков) составляет 5–8% и достигает 15–18% у более северных групп (финны, эстонцы, мордва, татары и др.) [7]. У русских частота аллеля *CCR5del32* довольно высока (от 10 до 17% в разных регионах), тогда как в другой изученной нами группе – калмыки – частота этого аллеля равна 2%. Могут ли различия в частоте протективного аллеля *CCR5del32* играть существенную роль в защите от ВИЧ-инфекции на популяционном уровне или объяснять различия в смертности ВИЧ-инфицированных?

Теоретически популяционные эффекты, обусловленные присутствием делеционного аллеля, можно оценить следующим образом. Пусть q – частота делеционного аллеля и S_{ww} , S_{wd} , S_{dd} – выживаемость инфицированных носителей генотипов *wt/wt*, *wt/CCR5del32*, *CCR5del32/CCR5del32* соответственно. Тогда средняя популяционная выживаемость S_{pop} превышает выживаемость носителей генотипа *wt/wt* на величину

$$\Delta S = S_{pop} - S_{ww} = (1 - q)^2 S_{ww} + 2q(1 - q)S_{wd} + q^2 S_{dd} - S_{ww} \approx 2(S_{wd} - S_{ww})q.$$

В последнем равенстве мы пренебрегли членами порядка q^2 . Таким образом, протективный эффект гетерозиготного носительства аллеля *CCR5del32* (40-процентное снижение смертности инфицированных) при частоте данного аллеля 10% дает 8-процентное снижение смертности в целом для ВИЧ-инфицированных по сравнению с группой, в которой носители аллеля отсутствуют. Аналогично рассчитывается снижение риска инфицирования за счет присутствия в популяции аллеля *CCR5del32*. Если вероятность инфицирования гетерозигот понижена на 13%, то в популяции в целом частота инфицирования снижена на 3.3%. При 15-процентной частоте аллеля снижение инфицируемости составило бы 5.6%, а смертности ВИЧ-инфицированных – 12%.

Таким образом, на популяционном уровне защита от инфицирования ВИЧ и снижение смертности ВИЧ-инфицированных даже в группах с высокой частотой *CCR5del32* (15%) невелика. Помимо *CCR5del32* имеются другие гены, которые влияют на восприимчивость к ВИЧ и ход развития ВИЧ-инфекции [61]

и могут вносить вклад в межпопуляционные различия. Например, русские и калмыки различаются по частотам протективного генотипа *C/C* по полиморфизму в регуляторном участке гена интерлейкина 10 *IL10-592 A/C* (49% у русских Ростовской обл. и 33% у калмыков Элисты) и по частотам протективного аллеля *CCR2-64I* (12% у русских Ростовской обл. и 23% у калмыков Элисты) (собств. неопубл. данные). Однако возможный вклад этих генов в межпопуля-

ционные различия развития ВИЧ-инфекции требует дальнейших исследований, в которых, как надеются авторы, выборки с нозокомиальными инфекциями более не будут доступны. ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-04-01281а) и Подпрограммы «Генофонды и генетическое разнообразие» Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bridge J., Lazarus J.V., Atun R. // AIDS. 2010. V. 24. Suppl 3. P. S86–S94.
2. Покровский В.В., Ерамова И.Ю., Деулина М.О., Липетиков В.В., Слюсарева Л.А., Чемизова Н.М., Савченко С.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1990. № 4. С. 17–23.
3. Покровский В. Эпидемиология и профилактика ВИЧ-инфекции и СПИДа. М.: Медицина, 1996.
4. Restrepo C., Rallón N.I., Carrillo J., Soriano V., Blanco J., Benito J.M. // AIDS Rev. 2011. V. 13. № 1. P. 30–40.
5. Martinson J.J., Chapman N.H., Rees D.C., Liu Y.T., Clegg J.B. // Nat. Genet. 1997. V. 16. № 1. P. 100–103.
6. Novembre J., Galvani A.P., Slatkin M. // PLoS Biol. 2005. V. 3. № 11. P. e339.
7. Balanovsky O., Pocheshkhova E., Pshenichnov A., Solovieva D., Kuznetsova M., Voronko O., Churnosov M., Tegako O., Atramentova L., Lavryashina M., et al. // J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci. 2005. V. 24. № 4. P. 375–382.
8. Huang Y., Paxton W.A., Wolinsky S.M., Neumann A.U., Zhang L., He T., Kang S., Ceradini D., Jin Z., et al. // Nat. Med. 1996. V. 2. P. 1240–1243.
9. Liu R., Paxton W.A., Choe S., Ceradini D., Martin S.R. // Cell. 1996. V. 86. P. 367–377.
10. Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C. // Nature. 1996. V. 382. P. 722–725.
11. Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., Goedert J., Buchbinder S.P., Vittinghoff E., Gomperts E., et al. // Science. 1996. V. 273. P. 1856–1862.
12. Marmor M., Sheppard H.W., Donnell D., Bozeman S., Celum C., Buchbinder S., Koblin B., Seage G.R., HIV Network for Prevention Trials Vaccine Preparedness Protocol Team. // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2001. V. 27. № 5. P. 472–481.
13. Agrawal L., Lu X., Qingwen J., VanHorn-Ali Z., Nicolescu I.V., McDermott D.H., Murphy P.M., Alkhatib G. // J. Virol. 2004. V. 78. P. 2277–2287.
13. Oh D.Y., Jessen H., Kücherer C., Neumann K., Oh N., Poggensee G., Bartmeyer B., Jessen A., Pruss A., Schumann R.R., et al. // PloS One. 2008. V. 3. № 7. P. e2747.
14. Hendel H., Hénon N., Lebuanec H., Lachgar A., Poncelet H., Caillat-Zucman S., Winkler C.A., Smith M.W., Kenefic L., O'Brien S., et al. // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. 1998. V. 19. P. 381–386.
15. Misrahi M., Teglas J.P., N'Go N., Burgard M., Mayaux M.J., Rouzioux C., Delfraissy J.F., Blanche S. // JAMA. 1998. V. 279. P. 277–280.
16. Ioannidis J.P., Contopoulos-Ioannidis D.G., Rosenberg P.S., Goedert J.J., De Rossi A., Espanol T., Frenkel L., Mayaux M.J., Newell M.L., Pahwa S.G., et al. // AIDS. 2003. V. 17. P. 1631–1638.
17. Mulherin S.A., O'Brien T.R., Ioannidis J.P., Goedert J.J., Buchbinder S.P., Coutinho R.A., Jamieson B.D., Meyer L., Michael N.L., Pantaleo G., et al. // AIDS. 2003. V. 17. P. 377–387.
18. Barroga C.F., Raskino C., Fangon M.C., Palumbo P.E., Baker C.J., Englund J.A., Spector S.A. // J. Infect Dis. 2000. V. 182. № 2. P. 413–419.
19. Казеннова Е.В., Ааронс Э., Селимова Л.М., Ладная Н.Н., Кравченко А.В., Жемчугов В.Е., Чейнсонг-Попов Р., Вебер Д., Покровский В.В., Бобков А.Ф. // Вопр. вирусологии. 1998. Т. 43. № 1. С. 30–32.
20. Шадрина М.И., Копылов В.М., Миросердова О.В., Сломинский П.А., Лимборская С.А. // Генетика. 2000. Т. 36. № 5. С. 718–720.
21. Adojaan M., Mölder T., Männik A., Kivisild T., Villems R., Krispin T., Ustav M. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2007. V. 23. № 2. P. 193–197.
22. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Garaev M., Rzhaninova A., Kaleebu P., Beddows S., Bachmann M.H., Mullins J.I., Louwagie J., Janssens W., et al. // AIDS. 1994. V. 8. № 12. P. 1649–1655.
23. Гафарова И.Э., Шидеева Ж.А., Санджиева Д.Б., Гараев М.М. // Вопр. вирусологии. 2010. Т. 55. № 1. С. 16–22.
24. Сломинский П.А., Шадрина М.И., Спицын В.А., Микулич А.И., Хуснутдинова Э.К., Лимборская С.А. // Генетика. 1997. Т. 33. № 11. С. 1596–1598.
25. Abramson J.H. // Epidemiol. Perspectives & Innovations. 2004. V. 1. P. 6.
26. Du Q., Wang F., Hong W., Liu M., Jin L., Shi H., Lei Z., E E. // Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2000. V. 6. P. 413–416.
27. Magierowska M., Lepage V., Boubnova L., Carcassi C., de Juan D., Djoulah S., El Chenawi F., Grunnet N., Hallo L., Ivanova R., et al. // Immunogenetics. 1998. V. 48. P. 417–419.
28. Кожекбаева Ж.М., Бородина Т.А., Боринская С.А., Гусар В.А., Фещенко С.П., Ахметова В.Л., Хусаинова Р.И., Гупало Е.Ю., Спицын В.А., Гречанина Е.Я., и др. // Генетика. 2004. Т. 40. № 10. С. 1394–1401.
29. Асеев М.В., Шауи А., Дин М., Баранов В.С. // Генетика. 1997. Т. 33. № 12. С. 1724–1726.
30. Libert F., Cochaux P., Beckman G., Samson M., Aksenova M., Cao A., Czeizel A., Claustres M., de la Rúa C., Ferrari M., et al. // Hum. Mol. Genet. 1998. V. 7. № 3. P. 399–406.
31. Voevodin A., Samilchuk E., Dashti S. // J. Med. Virol. 1998. V. 55. P. 147–151.
32. Limborska S.A., Balanovsky O.P., Balanovskaya E.V., Sломинский П.А., Шадрина М.И., Livshits L.A., Kravchenko S.A., Pampuha V.M., Khusnutdinova E.K., Spitsyn V.A. // Hum. Hered. 2002. V. 53. № 1. P. 49–54.
33. Yudin N.S., Vinogradov S.V., Potapova T.A., Naykova T.M., Sitnikova V.V., Kulikov I.V., Khasnulin V.I., Konchuk C., Vloshinskii P.E., Ivanov S.V., et al. // Hum. Genet. 1998. V. 102. P. 695–698.

34. Рябов Г.С., Казеннова Е.В., Корепанова Л.Б., Мальцева Е.А., Жалнин В.В., Красникова Л.А., Зверев С.Я., Покровский В.В., Бобков А.Ф., Вебер Дж.Н. // *Вопр. вирусологии*. 2002. Т. 42. № 4. С. 13–16.
35. Ryabov G.S., Kazennova E.V., Bobkova M.R., Bobkov A.F. // *Genet. Test*. 2004. V. 8. № 1. P. 73–76.
36. Morawetz R.A., Rizzardi G.P., Glauser D., Rutschmann O., Hirschel B., Perrin L., Opravil M., Flepp M., von Overbeck J., Glauser M.P., et al. // *Eur. J. Immunol*. 1997. V. 27. № 12. P. 3223–3227.
37. Lucotte G. // *Hum. Immunol*. 2001. V. 62. № 9. P. 933–936.
38. Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., Spalding T., Kubofcik J., Combadiere C., Weissman D., Cohen O., Rubbert A., Lam G., et al. // *Mol. Med*. 1997. V. 3. P. 23–36.
39. Eugen-Olsen J., Iversen A.K., Garred P., Koppelhus U., Pedersen C., Benfield T.L., Sorensen A.M., Katzenstein T., Dickmeiss E., Gerstoft J., et al. // *AIDS*. 1997. V. 11. P. 305–310.
40. Balotta C., Bagnarelli P., Violin M., Ridolfo A.L., Zhou D., Berlusconi A., Corvasce S., Corbellino M., Clerici M., et al. // *AIDS*. 1997. V. 11. № 10. P. 67–71.
41. Stewart G.J., Ashton L.J., Biti R.A., Ffrench R.A., Bennetts B.H., Newcombe N.R., Benson E.M., Carr A., Cooper D.A., Kaldor J.M. // *AIDS*. 1997. V. 11. № 15. P. 1833–1838.
42. Pastinen T., Liitsola K., Niini P., Salminen M., Syvänen A.C. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998. V. 14. № 8. P. 695–698.
43. Poljak M., Tomazic J., Seme K., Maticic M., Vidmar L. // *Acta Virol*. 1998. V. 42. № 1. P. 23–26.
44. Alvarez V., López-Larrea C., Coto E. // *Hum. Genet*. 1998. V. 102. № 4. P. 483–486.
45. Ruiz A., Royo J.L., Rubio A., Borrego S., Leal M., Sánchez B., Nuñez-Roldán A., Antiñolo G. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2001. V. 17. № 2. P. 191–193.
46. Barber Y., Rubio C., Fernández E., Rubio M., Fibla J. // *J. Infect Dis*. 2001. V. 184. № 10. P. 1279–1288.
47. Barabás E., Kemény B., González R., Várkonyi V., Nagy K., Horváth A. // *Int. J. STD AIDS*. 2002. V. 13. № 10. P. 691–697.
48. Philpott S., Burger H., Charbonneau T., Grimson R., Vermund S.H., Visosky A., Nachman S., Kovacs A., Tropper P., Frey H., et al. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 1999. V. 21. № 3. P. 189–193.
49. Bogner J.R., Lutz B., Klein H.G., Pollerer C., Troendle U., Goebel F.D. // *HIV Med*. 2004. V. 5. № 4. P. 64–72.
50. Liu H., Hwangbo Y., Holte S., Lee J., Wang C., Kaupp N., Zhu H., Celum C., Corey L., McElrath M.J. // *J. Infect. Dis*. 2004. V. 190. № 6. P. 1055–1058.
51. Wasik T.J., Smoleń J., Kruszyński P., Bratosiewicz-Wasik J., Beniowski M. // *Wiad Lek*. 2005. V. 58. № 9–10. P. 500–507.
52. Trecarichi E.M., Tumbarello M., de Gaetano Donati K., Tamburrini E., Cauda R., Brahe C., Tiziano F.D. // *AIDS Res Ther*. 2006. V. 25. P. 3–22.
53. Takácová M., Nogová P., Hábeková M., Staneková D. // *AIDS*. 2008. V. 11. № 15. P. 1833–1838.
54. Parczewski M., Leszczyszyn-Pynka M., Kaczmarczyk M., Adler G., Binczak-Kuleta A., Loniewska B., Boron-Kaczmarzka A., Ciechanowicz A. // *J. Appl. Genet*. 2009. V. 50. № 2. P. 159–166.
55. Egger M., Smith G.D., Schneider M., Minder C. // *Br. Med. J*. 1997. V. 315. P. 629–634.
56. Viera A.J. // *South Med. J*. 2008. V. 101. № 7. P. 730–734.
57. Salkowitz J.R., Purvis S.F., Meyerson H., Zimmerman P., O'Brien T.R., Aledort L., Eyster M.E., Hilgartner M., Kessler C., Konkle B.A., et al. // *Clin. Immunol*. 2001. V. 98. № 2. P. 200–211.
58. Lederman M.M., Alter G., Daskalakis D.C., Rodriguez B., Sieg S.F., Hardy G., Cho M., Anthony D., Harding C., Weinberg A., et al. // *J. Infect. Dis*. 2010. V. 202. Suppl. 3. P. S333–S338.
59. Parczewski M., Bander D., Leszczyszyn-Pynka M., Urbanska A., Kaczmarczyk M., Ciechanowicz A., Boron-Kaczmarzka A. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 7. P. e22215 (1–11).
60. He X.F., Jia Y.J., Su J., Chen Q., Zhu W.C., Yu S.Y. // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2011. V. 31. № 5. P. 791–795.
61. Piacentini L., Biasin M., Fenizia C., Clerici M. // *J. Intern. Med*. 2009. V. 265. № 1. P. 110–124.