

ГЕНЕТИКА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

О.О. Фаворова, О.Г. Кулакова, А.Н. Бойко

Абсолютное большинство всех заболеваний человека относят в настоящее время к комплексным (или многофакторным, или мультифакториальным) заболеваниям, понимая под этим, что причин их возникновения несколько, и они не до конца поняты. Одним из факторов, приводящих к развитию комплексных заболеваний, несомненно, является генетическая предрасположенность. Действительно, для комплексных заболеваний характерна семейная агрегация: риск заболеть тем же заболеванием у родственников больного выше, чем в популяции в среднем, и тем выше, чем короче генетическая дистанция по отношению к пробанду. Однако передача комплексных заболеваний в семьях происходит не по Менделевскому типу; такой тип наследования характерен для полигенных заболеваний, которые возникают в результате совместного вклада множества независимо действующих или взаимодействующих полиморфных генов, каждый из которых сам по себе вносит небольшой вклад в развитие заболевания. На фоне генетической предрасположенности действуют и остальные факторы риска, к которым в настоящее время относят воздействие внешней среды и так называемую эпигенетическую регуляцию, не связанную с изменениями нуклеотидной последовательности генома. Основная цель идентификации факторов риска того или иного комплексного заболевания состоит в том, чтобы получить инструменты для индивидуального прогноза предрасположенности к нему. Важный аспект таких исследований – выявление молекулярных основ патогенеза этого заболевания для разработки новых стратегий его профилактики и лечения.

Эта глава посвящена описанию стратегии и результатов исследований, в которых анализируется генетическая предрасположенность к рассеянному склерозу (РС) – тяжелому хроническому воспалительному заболеванию центральной нервной системы, характеризующемуся многоочаговой демиелинизацией. Описанные данные представляют и более широкий интерес, поскольку РС может рассматриваться как прототип широко распространенных комплексных заболеваний.

Количество больных РС составляет в мире составляет более 2,5 миллионов, а их лечение требует затрат миллиардов долларов. РС встречается практически во всех популяциях мира, однако чаще у жителей Северной Европы. При этом заболевание более распространено среди женщин. Весьма часто болезнь приводит к глубокой инвалидизации лиц молодого, трудоспособного возраста, вследствие чего РС представляет собой серьезную медико-социальную проблему.

Характер наследования при РС

Первые данные о возможной генетической предрасположенности к РС были получены из эпидемиологических исследований, выявивших разную частоту РС в разных этнических группах, проживающих на одной территории. РС чаще встречается в семьях больных РС, чем в популяции в целом, однако передача заболевания в семье происходит не по Менделевскому типу наследования, присущему моногенным заболеваниям. Величина относительного риска (ОР) заболевания для родственников больных РС в 20 - 50 раз выше, чем в популяции в среднем, причем наблюдается систематическое уменьшение ОР в зависимости от генетической дистанции по отношению к пробанду. В то же время, если один из однояйцевых близнецов болен РС, вероятность того, что второй генетически идентичный близнец также болен РС (этот признак в генетике называют уровнем конкордантности), составляет в реальности 25-30% вместо ожидаемых 100%. Этот факт привел к общепринятому мнению, что для развития заболевания необходимо еще и воздействие внешних факторов. Был предложен ряд гипотетических механизмов, опирающихся на определенные экспериментальные данные, согласно которым инфекционные агенты (*Chlamidia pneumoniae*, герпесвирус человека VI типа, вирус Эпштейна-Барр и др.) и внешние воздействия, такие как экологические условия зоны проживания, интоксикации, особенности питания, курение, стресс, климатические факторы (в частности, недостаточное пребывание на солнце, приводящее к дефициту витамина D) могут влиять на риск развития РС. Однако не обнаружено какого-либо одного специфического внешнего воздействия или инфекционного начала, являющихся первопричиной заболевания. В то же время, семейные исследования в особых группах: потомки одних родителей, т.е. родные братья и сестры (сибсы), братья и сестры по отцу или по матери (полусибсы), приемные дети, супружеские пары и др., выявили, что внешние факторы на семейном уровне менее важны, чем генетические.

В последнее время получило распространение другое объяснение низкого уровня конкордантности у гомозиготных близнецов, а именно наличие эпигенетической регуляции, не связанной с изменениями нуклеотидной последовательности генома, но влияющей на уровень транскрипции генов, существенных для развития РС. Так, уровень транскрипции генов может меняться при ковалентной модификации ДНК (в частности, ее метилирования) или гистоновых белков. Важно отметить, что воздействие внешних факторов может приводить к модуляции эпигенетических процессов, и реальной альтернативы между двумя гипотетическими причинами низкой конкордантности у гомозиготных близнецов не существует. Наличием эпигенетических механизмов, связанных со способностью половых гормонов модулировать экспрессию генов, в последнее время объясняют также более

широкую распространенность РС среди женщин. Наконец, интригующий факт низкой конкордантности у гомозиготных близнецов может быть связан еще и с возникновением спонтанных генетических изменений, таких как хромосомные aberrации или соматические перестройки генов Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов.

Так или иначе, в целом на сегодняшний день господствует представление, что развитие РС, как и большинства других комплексных заболеваний, зависит как от генетической компоненты, определяющейся вкладом вариантов ряда генов, так и от других факторов, находящихся в запрограммированном или случайном взаимодействии друг с другом. Сложность этих взаимодействий не позволяет однозначно предсказать возникновение РС исходя из отдельно взятого признака, однако выявление значимого эффекта каждого отдельного гена на развитие или характер течения РС может способствовать пониманию биологической природы заболевания.

Поиск генов, вовлеченных в развитие РС

Генетическую предрасположенность к РС как к полигенному заболеванию изучают, анализируя распределение у больных и здоровых тех или иных полиморфных вариантов генома. Такие варианты ДНК часто возникают вследствие однонуклеотидных замен (single nucleotide polymorphisms, или SNP) или варьирующего числа так называемых микросателлитных повторов – повторяющихся фрагментов ДНК длиной от 1 до 6 пар оснований (п.о.). Реже сравнивают распределение инсерций/делеций (INDELs) или варьирующих по числу tandemных минисателлитных повторов длиной от 7 до 100 п.о. (variable number tandem repeats, или VNTR).

Поиск генов, вовлеченных в развитие РС, до последнего времени проводили при помощи двух основных подходов: 1) анализа ассоциации отдельных «генов-кандидатов» с заболеванием и 2) анализа сцепления с заболеванием широкого спектра хромосомных локусов (полный геномный поиск) в семьях с несколькими больными РС. При полном геномном поиске использовали панели более или менее равномерно распределенных по геному маркеров с известной хромосомной локализацией, но неизвестной функцией (так называемые анонимные генетические маркеры). С их помощью можно локализовать области генома, вовлеченные в развитие данного заболевания, и далее в найденных областях проводить поиск генов, сцепленных с данным заболеванием. В отличие от этого подхода, который можно определить как путь «от генома к гену», при подходе «ген-кандидат» предположение о возможном участии гена в этиопатогенезе заболевания выдвигают исходя из природы заболевания и функции продукта гена (путь «от фенотипа к гену»), а далее проверяют это предположение.

Анализ ассоциации «генов-кандидатов» с РС

Ассоциацию того или иного полиморфного участка генома с заболеванием анализируют путем сравнения распределения его аллелей и генотипов в репрезентативных выборках неродственных больных и неродственных здоровых индивидов («случай – контроль»), соответствующих друг другу по соотношению полов, возрасту и этнической принадлежности. При этом анализируемые аллельные варианты могут быть локализованы в любом участке ДНК, включая как кодирующие последовательности генов (экзоны), несинонимические замены в кодонах которые приводят к замене аминокислотных остатков в последовательности конечной белковой молекулы, так и расположенные в генах между экзонами некодирующие участки - интроны, а также промоторные области генов, где очень часто находятся участки регуляции транскрипции, и другие области ДНК. Если частоты аллелей и/или генотипов анализируемого полиморфного участка статистически значимо различаются в сравниваемых группах, делают вывод об его ассоциации с заболеванием. Не следует забывать, однако, что помимо прямой связи между исследуемым локусом и наследственной патологией, в основе ассоциации может лежать неравновесие по сцеплению между маркерным локусом и локусом болезни, если эти локусы расположены достаточно близко друг от друга. Кроме того, наблюдаемая ассоциация может оказаться артефактом еще и в случае неоднородности популяции. Поэтому важным условием значимости результатов, полученных методом «случай-контроль», является использование гомогенных популяций или семейного материала, когда контрольную группу составляют из тех аллелей здоровых родителей, которые не передаются больным потомкам. Ассоциацию на материале семей с одним пораженным потомком анализируют также с помощью теста на неравновесие по переносу (transmission-disequilibrium test, TDT), основанного на анализе случаев передачи маркерного аллеля или гаплотипа (совокупности аллелей на локусах одной хромосомы, обычно наследуемых вместе) от гетерозиготных родителей.

Гены HLA и РС. Предположение об участии генов HLA, входящих в главный комплекс гистосовместимости (ГКГ), в формировании генетической предрасположенности к РС как заболеванию аутоиммунной природы было выдвинуто в ранние 1970-е годы исходя из представления о ведущей роли кодируемых этими генами белковых молекул в иммунном ответе.

ГКГ занимает около 2.5 млн. п.о. ДНК на хромосоме 6p21.3 и представляет собой кластер тесно сцепленных полиморфных генетических локусов трех классов (I - III), кодирующих более 200 белковых продуктов, большинство из которых связано с иммунным ответом. Биологическая функция высокополиморфных гликопротеинов – HLA-молекул ГКГ

классов II и I – состоит в презентации на поверхности клеток пептидных фрагментов процессированного антигена рецепторам Т-клеток CD4+ и CD8+ фенотипов, соответственно, что и определяет иммунологическую реакцию индивида на антиген. Известно, что при РС демиелинизация, т.е. разрушение белково-липидной оболочки аксонов, происходит с участием аутоиммунных механизмов. Существенное значение для запуска и поддержания демиелинизирующего процесса при РС имеют выраженность и длительность транзиторного повышения уровней экспрессии молекул HLA на эндотелии сосудов мозга, астроцитах и микроглии.

Результаты более 250 исследований, свидетельствующих о значении HLA-генов для развития РС, суммированы на сайте www.acceleratedcure.org. Ведущая роль генов HLA класса II в формировании генетической предрасположенности к РС выявлена почти во всех исследованных популяциях, хотя наблюдаются существенные этнические различия. В большинстве работ обнаруживали ассоциацию с РС каких-либо аллелей генов областей *DR* или *DQ* HLA класса II, а также их протяженного гаплотипа. Многочисленные исследования, выполненные на популяциях северных европеоидов, включая русских, выявили устойчивую ассоциацию с гаплотипом *DRB1*1501,DQA1*0102,DQB1*0602* (так называемый гаплотип DR15). Поскольку этот гаплотип находится в сильном неравновесии по сцеплению, оставалось неясным, какой из входящих в него генов играет основную роль в формировании предрасположенности к РС. Исследование, проведенное на популяции американцев африканского происхождения, для которых по сравнению с североевропейцами характерны большее разнообразие гаплотипов и другая структура сцепления, выявило избирательную ассоциацию с аллелем (точнее, группой аллелей) *DRB1*15*. Эти данные позволили высказать предположение, что локус *DRB1* является главным генетическим фактором риска РС. Однако, в последнее время показано, что все три гена гаплотипа DR15 вносят вклад в предрасположенность к РС, находясь во взаимодействии друг с другом (так называемое эпистатическое взаимодействие).

Обнаружены ассоциации РС и с другими аллелями гена *DRB1* (таблица 1). Для жителей Сардинии характерна ассоциация с *DRB1*0301*, *DRB1*0405* и *DRB1*1303* [52], которые оказались факторами риска РС также и в ряде других популяций. В континентальной Италии наблюдали снижение риска при носительстве аллелей *DRB1*07*, а в Японии - *DRB1*09*. В таблице 1 отражены также недавние новые исследования ассоциаций РС с HLA, выполненные на тысячах больных из Северной Европы. Обнаружены, в дополнение к *DRB1*1501*, другие группы аллелей гена *DRB1* (*03, *01, *10, *11, *14, *08), которые позитивно или негативно связаны с РС. Однако, эффект носительства группы аллелей *DRB1*15* является самым сильным фактором риска РС среди всех аллелей гена *DRB1*:

отношение шансов – величина, показывающая, во сколько раз шансы заболеть в группе носителей *DRB1*15* выше, чем шансы заболеть в группе без этого фактора риска, – достигает значения 3 и более. Как следствие, носительством аллеля *DRB1*1501* можно объяснить от 20 до 60% всех случаев РС у европеоидов.

Таблица 1.

Примеры ассоциации распространенных групп аллелей гена HLA *DRB1* с РС в разных популяциях мира.

Группа аллелей гена HLA <i>DRB1</i>	Популяции	Примерное значение ОШ*
*01	Канада, Швеция, Великобритания, США	0.6
*02(15)	Почти повсеместно	3
*03(17)	Сардиния, Канада, Швеция, Великобритания, США, Россия (русские), Италия, Сицилия, Испания, Северная Африка	1.7
*04	Сардиния, Северная Африка, Канарские острова	2.2
*07	Италия	0.6
*08	Канада, Великобритания, США, Италия, Сицилия, Испания (генотип *15/*08)	6 (для генотипа *15/*08)
*09	Япония	0.4
*11	Канада, Мальта	0.7
*13	Сардиния, Израиль	2
*14	Канада, Великобритания, США, Италия, Сицилия, Испания	0.3

* ОШ – отношение шансов

Наблюдается также влияние дозы аллеля *DRB1*15* на восприимчивость к РС: для гомозигот *DRB1*15/*15* отношение шансов увеличивается примерно вдвое по сравнению с гетерозиготами. Наблюдали также сильный предрасполагающий эффект генотипа *DRB1*15/*08*, причем влияние аллеля *DRB1*08* проявлялось только в присутствии *DRB1*15*. Исходя из этих данных, предложена модель патогенеза РС, предполагающая, что сложные взаимодействия аллелей *DRB1* на разных хромосомах могут определять баланс между восприимчивостью и устойчивостью к РС [11].

Хотя ранние результаты относительно ассоциации РС с генами класса I, независимой от HLA класса II, неоднозначны из-за наличия сильного неравновесия по сцеплению в пределах всей области HLA, на сегодняшний день благодаря исследованиям, выполненным на больших группах больных РС и здоровых контролей, можно считать доказанным значение генов класса I – HLA-A и HLA-C – как независимых факторов риска РС. Оказалось, что эффект протяженных гаплотипов, содержащих аллель *DRB1*15*, может меняться от предрасполагающего, причем в 2-4 более сильного, чем для одного *DRB1*15*, до протективного в зависимости от того, какие аллели генов HLA класса I входят в эти

гаплотипы. Величины отношения шансов для носителей различных протяженных гаплотипов могут различаться более чем в 20 раз; столь существенные различия в риске РС могут быть связаны с структурными особенностями молекул HLA, определяющими дифференциальную презентацию аутоантигенных пептидов.

В целом, современный уровень знаний соответствует представлению об «оркестре» генов HLA, которые находятся в неравновесном сцеплении и эпистатическом взаимодействии, регулируя вовлеченность друг друга в формирование предрасположенности к РС. Необходимо отметить, однако, что вклад генов HLA в развитие РС меньше, чем в развитие других аутоиммунных заболеваний, например, инсулинзависимого диабета.

Не-HLA гены и РС. В отличие от ситуации с генами HLA, сотни исследований, направленных на выяснение вклада других генов-кандидатов в развитие РС, далеко не во всех случаях привели к однозначным выводам. В **таблице 2** представлен перечень не-HLA генов, для которых по меньшей мере в двух независимых исследованиях и, как правило, в разных популяциях найдены ассоциации с РС.

Таблица 2. Не-HLA гены, для которых более чем в двух независимых исследованиях найдены значимые ассоциации с РС ($p < 0.05$).

Хромосома	Ген(ы)	Локализация гена	Белковый(ые) продукт(ы)	Число исследований*	
				Общее	с позитивными результатами
1	<i>SH2D2A</i>	1q21	специфический адаптерный белок Т клеток (TSA _d)	2	2
	<i>FAS ligand</i>	1q23	Fas-лиганд	3	2
	<i>PTPRC</i>	1q31-q32	рецептор протеин-тирозинфосфатазы типа С (CD45)	11	2
	<i>IL10</i>	1q31-q32	интерлейкин 10	13	2
2	<i>IL1ra</i>	2q14.2	антагонист рецептора интерлейкина 1	15	2
	<i>CTLA4</i>	2q33	ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок	26	4
3	<i>CCR5, CCR2</i>	3p21	рецепторы СС-хемокинов 2 и 5	16	
4	<i>OPN</i>	4q21-q25	остеопонтин (секретируемый фосфопротеин 1)	5	2
	<i>IL2</i>	4q26-q27	интерлейкин 2	9	2
5	<i>IL7RA</i> (<i>IL7R alpha</i> , <i>CD127</i>)	5p13	альфа-цепь рецептора интерлейкина 7	6	5
	<i>IL4</i>	5q31.1	интерлейкин 4	11	2

6	<i>TNF (TNF alpha) и LT alpha (TNF beta)</i>	6p21.3	фактор некроза опухолей (ФНО альфа) и лимфотоксин альфа (ФНО бета)	39	14
	<i>MOG</i>	6p22-p21.3	миелиновый олигодендроцитный гликопротеин	9	2
	<i>CD24</i>	6q21	поверхностный антиген В-лимфоцитов и гранулоцитов CD24	3	2
	<i>ESR1 (ESR, ERG)</i>	6q25.1	эстрогеновый рецептор 1	4	3
7	<i>TAC1</i>	7q21-q22	протахикинин 1 (protachykinin-1)	2	2
	<i>PAI1 (serpine 1)</i>	7q21.3-q22	ингибитор 1 активатора плазминогена (серфин 1)	4	3
	<i>TCR beta</i>	7q35	бета-цепь Т-клеточного рецептора	21	2
10	<i>Fas (CD95)</i>	10q24.1	Fas (белок 6 суперсемейства рецепторов ФНО)	6	2
	<i>IL2RA (IL2R alpha, CD25)</i>	10p15	альфа-цепь рецептора интерлейкина 2, CD25	3	2
11	<i>UCP2</i>	11q13	разобщающий белок 2	2	2
12	<i>VDR</i>	12q12-q14	рецептор витамина D	7	3
	<i>IFN gamma</i>	12q14-q15	интерферон гамма	14	2
16	<i>СИТА (MHC2TA)</i>	16p13	трансактиватор МНС класса II (СИТА)	4	2
	<i>IL4R</i>	16p12.1-p11.2	рецептор интерлейкина 4	8	2
17	<i>RANTES (CCL5)</i>	17q11.2-q12	лиганд СС-хемокинов 5 (CCL5, RANTES)	3	2
	<i>CCL3, (MIP1 alpha, SCYA3)</i>	17q11-q21	лиганд СС-хемокинов 3 (CCL3, воспалительный белок макрофагов 1 альфа, малый индуцибельный цитокин А3)	4	2
18	<i>MBP</i>	18q23	основной белок миелина	20	4
19	<i>ICAM1</i>	19q13	молекула адгезии ICAM-1	8	3
	<i>APOE</i>	19q13	аполипопротеин E	27	3

*Исследования, для которых не указана этническая принадлежность/национальность индивидов (в основном работы 80-х - 90-х годов), не учитывали.

Из-за возможности ложно-положительных ассоциаций подобное воспроизведение ассоциации на независимых выборках больных и контрольных групп (валидация, или репликация) рассматривается на сегодняшний день как необходимый критерий для доказательства роли того или иного гена/аллеля как фактора риска заболевания. Как видно из

данных таблицы, ассоциированные с РС гены, обнаружены на большинстве хромосом. Однако в большинстве случаев результаты остаются противоречивыми, поскольку ассоциации выявлены только в незначительной части проведенных для данного гена исследований, число которых в ряде случаев достигает нескольких десятков. Важным исключением является ген *IL7RA*, кодирующий альфа-цепь рецептора интерлейкина-7 и расположенный на хромосоме 5p13. Для этого гена в 5 из 6 опубликованных исследований, наиболее масштабные из которых выполнены в 2007-2008 гг. для разных этнических групп, идентифицирована несинонимическая замена оснований в экзоне 6, более распространенный аллель которой высоко достоверно увеличивает риск развития РС. Из данных таблицы 2 следует также, что для ряда генов, локализованных на хромосомах 1 (*SH2D2A*, *FAS ligand*), 6 (*CD24*), 7 (*TAC1*, *PAII*), 10 (*IL2RA (CD25)*), 11 (*UCP2*) и 17 (*RANTES (CCL5)*) во всех проведенных исследованиях или за исключением одного из них обнаружена ассоциация с РС, хотя для каждого из названных генов общее число публикаций не велико (от 2 до 4). Многие из генов, представленных в таблице, так или иначе, вовлечены в процесс воспаления. Они кодируют или различные про- и противовоспалительные цитокины и их рецепторы, или антигены, против которых может быть направлен аутоиммунный ответ (например, белки оболочки миелина MBP и MOG). Необходимо отметить, что вклад каждого из ассоциированных с РС генов является небольшим (например, для *IL7RA* носительство аллеля предрасположенности увеличивает риск заболеть РС всего в 1.2-1.3 раза, что может быть следствием полигенной природы РС.

Отдельного обсуждения заслуживают не-HLA гены, локализованные в области ГКГ. Множество данных свидетельствует о том, что некоторые из них независимо от генов HLA влияют на восприимчивость к РС. Как и в случае генов HLA класса I, встает вопрос о том, не возникают ли эти ассоциации вследствие неравновесия по сцеплению с основным фактором риска РС – геном *DRB1* HLA класса II.

Анализ сцепления генетических локусов с РС

Сцепление генетических локусов с заболеванием исследуют на семьях, более чем один член которых болен РС (мультиплексные семьи), с тем, чтобы проследить наследование заболевания и идентифицировать области генома, которые отклоняются от независимой сегрегации и ко-сегрегируют с заболеванием. При этом оцениваются шансы (вероятности) за и против сцепления в данной семье. Количественным показателем сцепления является логарифм соотношения шансов (правдоподобия) за и против сцепления - lod score (от английского "logarithm of odds ratio"), или лод-балл.

Анализ сцепления с использованием в качестве маркеров сотен высоко полиморфных

микросателлитных повторов, относительно равномерно распределенных по геному, был проведен более чем в 30 исследованиях, выполненных в разных странах на мультиплексных семьях с РС разной этнической принадлежности. По известным из публикаций данным также проведено три мета-анализа, объединяющие и обобщающие полученные результаты.

Области положительного сцепления, характеризующиеся максимальным логарифмом отношения шансов (maximum lod scores - MLS) более 2 или же непараметрическим сцеплением (nonparametric linkage - NPL) более 2,1, что соответствует шансам в пользу сцепления $\geq 100:1$, были обнаружены на большинстве хромосом, что демонстрирует полигенную природу РС. Однако, в большинстве случаев полный геномный поиск в различных этнических группах, равно как мета-анализ объединенных данных, не дали совпадающих результатов, что может свидетельствовать о генетической гетерогенности РС в разных популяциях. Единственное исключение составлял локус HLA класса II, MLS для которого достигал 4.24 и участие которого в развитии РС было убедительно показано ранее при анализе ассоциации (см. выше).

Следующим шагом в анализе генетической предрасположенности к РС стало опубликованное в конце 2005 г. исследование Международного генетического консорциума по РС (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, или IMSGC), в котором в 730 семьях с несколькими больными анализировали сцепление с РС не микросателлитных повторов, а более чем 4500 полиморфных участков с однонуклеотидными заменами (SNP), которые менее информативны, чем МКП, поскольку формируют только два аллеля, но зато гораздо более часто встречаются в геноме. Полученное в этой работе значение MLS для локуса HLA, равное 11.7, свидетельствует о значительно большей мощности этого поиска с высокой плотностью покрытия генома SNP-маркерами по сравнению с предыдущими исследованиями. Однако, и в этом случае за пределами HLA не было выявлено участков с высоко достоверным сцеплением. Таким образом, анализ сцепления отдельных областей генома с РС оказался подходом не только трудоемким, но и недостаточно информативным, скорее всего, вследствие его низкой чувствительности. На смену ему в последние годы пришел взявший все лучшее от предыдущих исследований метод поиска ассоциаций по всему геному (genome-wide association screening или genome-wide association study, сокращенно GWAS или GWA).

Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS)

Этот тип анализа предрасположенности к полигенным заболеваниям, получивший в последнее время широкое распространение, опирается на огромные возможности современных методов высокопроизводительного анализа ДНК. Это дает возможность

маркировать блоки гаплотипов один за другим, уменьшая возможность пропустить важные гены при анализе методом «случай-контроль». В то же время, в результате проведения огромного количества тестов, повышается риск ложно-положительных результатов и возрастает необходимость валидации выявленных ассоциаций.

GWAS основан на анализе различий в частотах, распределенных по всему геному аллелей, однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в выборках неродственных больных и индивидов контрольной группы с использованием микрочипов (а в последние годы и более современных технологий), позволяющих одновременно генотипировать от нескольких десятков тысяч до нескольких миллионов SNP в одном образце. При этом стоимость такого эксперимента невелика, и поэтому в рамках одного исследования можно генотипировать сотни и тысячи больных и контрольных индивидов. В исследования GWAS включают только такие полиморфизмы, в которых минорный аллель относится к «распространенным», т.е. встречается в популяции с частотой более 1%. Полиморфизмы с частотой минорного аллеля менее 1%, а в большинстве случаев и менее 5%, не рассматриваются, поскольку для убедительных выводов об их ассоциации с заболеванием требуется выборка очень большого размера для обеспечения статистической мощности.

Исследование GWAS состоит из двух этапов. На первом, экспериментальном, происходит формирование групп сравнения, клиническое атрибутирование больных, оформление нужных документов, таких как информированное согласие, сбор образцов ДНК и, наконец, собственно генотипирование на платформах для полногеномного поиска. На втором проводят статистический и биоинформатический анализ полученных данных для выявления ассоциаций. Как правило, этот двухэтапный процесс составляет только первую фазу исследования (discovery stage), а затем он повторяется на независимых выборках с целью подтвердить найденные ассоциации во второй, репликационной фазе исследования (replication stage).

Поскольку данные генотипирования по большому количеству аллелей позволяют однозначно идентифицировать индивида и могут характеризовать состояние его здоровья, они не должны попадать в свободный доступ. Поэтому на них распространяются те же или похожие юридические ограничения, что и на другие персональные медицинские данные. С другой стороны, обмен такими данными между лабораториями совершенно необходим для повышения эффективности исследований генетической картины заболеваний, поскольку открывает возможность проведения биоинформатического анализа на объединенных результатах, полученных несколькими экспериментальными группами. С этой целью в мире создано несколько баз данных по GWAS. В них включают результаты полногеномного эксперимента, открываемые исследователями после публикации результатов проведенного

ими анализа.

Данные полногеномных исследований различных комплексных заболеваний, в том числе и РС, представлены в хронологическом порядке в регулярно обновляющемся каталоге на сайте Национального института изучения генома человека США (National Human Genome Research Institute, NHGRS). Каталог включает 13 GWAS, в которых исследовали предрасположенность к РС в различных популяциях (в основном, среди европеоидов). Ведущая роль в проведении GWAS принадлежит Международным консорциумам, владеющим образцами ДНК индивидов из разных клиник мира.

GWAS проводят на платформах полногеномного поиска производства компаний “Affymetrix” или “Illumina”, причем совершенствование технологии обеспечивает повышение числа тестируемых SNP, более или менее равномерно распределенных по геному. Так, в 2007 г. некоторые платформы для полногеномного поиска содержали немногим более 14.000 SNP, а в 2011 г. их число достигло примерно 600.000. По мере совершенствования экспериментальных платформ растет количество выявляемых ассоциаций. С другой стороны, увеличивается число одновременно проверяемых гипотез, вследствие чего возрастает риск ложноположительных ассоциаций. Одновременно повышаются требования к уровню значимости результатов полногеномных исследований, соответствующие в настоящее время значению $p < 5 \times 10^{-8}$, в котором учтена поправка Бонферрони на 1.000.000 сравнений. Как следствие, растет минимально необходимый размер выборки. Действительно, если до 2009 г. количество больных в отдельных GWAS составляло менее 1.000 человек, то, начиная с 2011 г., в ряде исследований оно уже превышало 10.000 человек.

В случае РС увеличение выборки больных часто достигается за счет включения в исследование больных с разными формами заболевания. Известно, что РС характеризуется значительной клинической гетерогенностью. Выделяют несколько форм РС: наиболее частым является ремитирующий РС, при котором обострения чередуются с ремиссиями, и спустя определенное время наблюдается переход во вторично-прогрессирующую форму РС с непрерывным нарастанием неврологического дефицита. Выделяют также клинически изолированный синдром, предшествующий развитию ремитирующему РС. Реже наблюдается первично-прогрессирующее течение РС. К сожалению, на сегодняшний день в большинстве GWAS объединяли больных с разными формами РС и даже с клинически изолированным синдромом.

В результате GWAS, проведенных в период с 2007 до 2013 г., обнаружено более 120 различных локусов, значимо ассоциированных с РС. Эти полиморфные участки находятся в разных генах и на разных хромосомах. Ассоциации найдены на многих, но не на всех

хромосомах, причем гены, ассоциированные с РС, распределены по ним неравномерно. Больше всего полиморфных вариантов, ассоциированных с РС, найдено на хромосомах 1 и 6 (соответственно, семь и пять локусов), тогда как на семи хромосомах (4, 13, 15, 18, 21, X и Y) их не обнаружили. Всего выявлено 45 локусов, ассоциированных с РС с уровнем значимости $p < 5 \times 10^{-8}$.

Перечень тех локусов, ассоциация аллелей которых с РС найдена хотя бы в двух из проведенных GWAS и при этом хотя бы в одном имела $p < 5 \times 10^{-8}$, приведен в **таблице 3**. Введение этого дополнительного ограничения уменьшило число ассоциированных с РС локусов с 45 до 17. Количество хромосом, на которых не выявлено ассоциаций, соответствующих более жесткому критерию, увеличилось с семи до 14, а число ассоциированных локусов на самой “заселенной” хромосоме 1 – уменьшилось с семи до трех. Ассоциация с РС локусов, приведенных в **таблице 3**, может считаться убедительно доказанной, по крайней мере, для европеоидов. Данные этой таблицы показывают, что в разных исследованиях найдены ассоциации с РС различных SNP, локализованных в одном и том же гене или в некодирующих участках, расположенных в относительной близости от него. Чаще всего это происходит при использовании при полногеномном поиске разных панелей SNP и может отражать сцепление между этими SNP. При этом любой из ассоциированных с РС SNP может быть как собственно функционально важным полиморфизмом (causative SNP), так и SNP-меткой (tag-SNP) другого функционально важного полиморфизма, не выявленного напрямую.

Таблица 3. Ассоциированные с РС аллели полиморфных локусов, выявленные как минимум в двух исследованиях методом GWAS, из которых по крайней мере в одном достигнут уровень значимости с величиной $p < 5 \times 10^{-8}$ (по данным каталога NHGRS)

Хромосома	Локус	Ген	rs ID*	Локализация SNP	Аллель риска	Величина p	ОШ
1	1p22.1	<i>EVI5, RPL5</i>	rs6604026	Интронная	G	8.0×10^{-6}	1.15
						2.5×10^{-6}	1.17
			rs11810217	Интронная	A	6.5×10^{-12}	1.15
	1p13.1	<i>CD58</i>	rs2300747	Интронная	A	3.0×10^{-10}	1.30
						9.6×10^{-8}	1.28
			rs1335532	Интронная	A	2.0×10^{-9}	1.18
1q31.2	<i>RGS1</i>	rs2760524	Межгенная	G	9.8×10^{-6}	1.15	
		rs1323292	Межгенная	A	2.3×10^{-8}	1.12	
3	3p24.1	<i>EOMES</i>	rs170934	Межгенная	T	1.6×10^{-8}	1.17
			rs11129295	Межгенная	A	1.2×10^{-9}	1.11
5	5p13.2	<i>IL7RA</i>	rs6897932	Экзонная	C	3.0×10^{-7}	1.18
						2.0×10^{-6}	1.12
						1.7×10^{-8}	1.11
	5p13.1	<i>PTGER4</i>	rs6896969	Межгенная	C	2.0×10^{-7}	1.10
rs4613763			Межгенная	G	6.9×10^{-16}	1.21	

6	6p21.32	<i>HLA-DRB1</i>	-			$<1.0 \times 10^{-20}$	-
			rs3129934	Интронная		9×10^{-11}	3.30
						$<1.0 \times 10^{-32}$	Н.п.
						6.7×10^{-16}	2.34
			rs3135388	Интронная		9×10^{-81}	1.99
						4.0×10^{-225}	2.75
			rs9271366	Межгенная		7.0×10^{-184}	2.78
				4.0×10^{-17}	2.62		
	rs2040406	Межгенная		1.0×10^{-20}	2.05		
	rs3129889	Межгенная		1.0×10^{-206}	2.97		
	Н.п.			$<1.0 \times 10^{-320}$	3.10		
	6q23.3	<i>OLIG3, TNFAIP3, IL22RA2, AHI1</i>	rs9321619	Межгенная	G	1.7×10^{-5}	1.12
			rs13192841	Межгенная	A	1.0×10^{-8}	1.10
			rs17066096	Межгенная	G	6.0×10^{-13}	1.14
rs11154801			Интронная	A	1.0×10^{-13}	1.13	
10	10p15.1	<i>IL2RA</i>	rs12722489	Интронная	C	3.0×10^{-8}	1.25
						3.7×10^{-8}	1.23
			rs2104286	Интронная	A	9.0×10^{-8}	1.15
						7.4×10^{-6}	1.16
				2.0×10^{-9}	1.12		
	rs7090512	Межгенная	G	2.6×10^{-14}	1.19		
	10q22.3	<i>ZMIZ1</i>	rs1250540	Интронная	G	2.0×10^{-6}	1.12
rs1250550			Интронная	A	6.3×10^{-9}	1.10	
rs1250542			Интронная	A	4.0×10^{-7}	1.15	
11	11q12.2	<i>CD6</i>	rs17824933	Интронная	G	4.0×10^{-9}	1.18
			rs650258	Межгенная	G	1.7×10^{-9}	1.12
12	12p13.31	<i>TNFRSF1A</i>	rs4149584	Экзонная	T	5.0×10^{-6}	1.58
			rs1800693	Интронная	C	2.0×10^{-11}	1.20
				1.8×10^{-10}	1.12		
	12q14.1	<i>METTL1, CYP27B1</i>	rs703842	Межгенная	A	5.0×10^{-11}	1.23
rs12368653			Межгенная	A	2.0×10^{-7}	1.11	
16	16p13.13	<i>CLEC16A</i>	rs6498169	Интронная	G	4.0×10^{-6}	1.14
			rs11865121	Интронная	C	2.0×10^{-7}	1.15
			rs7404554*	Интронная	G	1.1×10^{-4}	1.18
			rs7200786	Интронная	A	6.3×10^{-14}	1.15
	16q24.1	<i>IRF8</i>	rs17445836	Межгенная	G	4.0×10^{-9}	1.25
			rs13333054	Межгенная	A	1.0×10^{-8}	1.12
17	17q21.2	<i>STAT3</i>	rs744166	Интронная	G	2.8×10^{-10}	1.15
						6.4×10^{-6}	1.13
			rs9891119	Интронная	C	2.0×10^{-10}	1.10
			rs2293152	Интронная	C	4.1×10^{-8}	1.22
20	20q13.12	<i>CD40</i>	rs6074022	Межгенная	C	1.3×10^{-7}	1.20
						4.9×10^{-6}	1.15
			rs2425752	Интронная	A	5.0×10^{-10}	1.10

Указаны значения p , полученные для объединенных данных первой и второй стадий исследования. Жирным шрифтом выделены значения $p < 5 \times 10^{-8}$.

* Индивидуальный идентификатор каждого SNP (reference SNP cluster ID).

** Генотипирование в фазе репликации провести не удалось; приведены результаты, полученные на первой стадии исследования.

В этой связи активно развиваются исследования, направленные на установление биологической роли выявленных методом GWAS функционально важных полиморфизмов. Помимо результатов, включенных в каталог NHGRS, используют также данные, полученные на новом микрочипе от Illumina (ImmunoChip, или Иммуночип), в котором увеличена плотность покрытия генома в областях, которые с наибольшей вероятностью вовлечены в развитие аутоиммунных заболеваний. В частности, такой анализ выявил функциональную значимость SNP rs6897932, rs2104286 и rs1800693 генов цитокиновых рецепторов *IL7RA*, *IL2RA* и *TNFRSF1A*, соответственно, поскольку носительство разных аллельных вариантов этих генов приводит к различному соотношению мембраносвязанного и растворимого рецепторов. При этом важно, что во всех случаях носительство аллеля риска связано с повышением уровня растворимой формы рецептора. Возможен также вариант, когда разные полиморфные участки в пределах одного гена не находятся в сильном сцеплении и дают независимые ассоциации с РС (в частности, предполагается независимый эффект двух однонуклеотидных полиморфизмов в гене *TNFRSF1A*). Также стоит отметить преимущественно интронную и межгенную локализацию ассоциированных с РС однонуклеотидных полиморфизмов, что может указывать на их регуляторную роль.

В целом, показано, что большинство генов, ассоциированных с РС, вне зависимости от функций, экспрессируются в клетках иммунной системы, а многие напрямую вовлечены в функционирование иммунной системы. Практически во всех полногеномных исследованиях, как и в исследованиях методом «случай – контроль», выявлена высокозначимая ассоциация с РС локуса HLA, важнейшая роль генов которого состоит в генетическом контроле иммунного ответа. Уровень значимости ассоциаций достигает величины $p < 1 \times 10^{-320}$, при этом величина эффекта этого локуса существенно выше, чем остальных, не-HLA-генов, и лежит в диапазоне ОШ от 2,05 до 3,3, по сравнению с величинами 1,1–1,3 для большинства не-HLA SNP. Наиболее значимые сигналы картированы в гене *HLA-DRB1* класса.

Анализируя роль ассоциированных с РС не-HLA-генов, следует отметить, что белковые продукты многих из них непосредственно участвуют в функционировании Т- или В-лимфоцитов. Большая группа генов кодирует белки-участники сигнального пути NF- κ B и вовлечена в развитие воспалительного ответа. Белковые продукты генов *STAT3*, *IRF8*, *TYK2*, *ZMIZ1* участвуют в сигнальных путях JAK/STAT, регулирующих экспрессию цитокинов и влияющих на развитие иммунного ответа.

Среди выявленных генов есть те, которые в большей или меньшей степени экспрессируются в тканях нервной системы: *EOMES*, *OLIG3*, *GALC*, *AH11*, *RPL5*, *MMEL1*. Транскрипционный активатор белок эомезодермин, кодируемый геном *EOMES*, играет

важнейшую роль в ранней дифференцировке организма и головного мозга, и в то же время принимает участие в дифференцировке CD8⁺ Т-клеток. Продукт гена *GALC* – фермент галактозилцерамидаза – участвует в лизосомном катаболизме галактозилцерамида, основного гликолипида миелиновой оболочки аксонов.

Функциональная роль других выявленных методом GWAS генов в предрасположенности к РС не столь очевидна; они кодируют и факторы транскрипции, и белки семейства цитохромов (*CYP24A1*, *CYP27B1*), и многие ферменты. Заслуживает отдельного внимания тот факт, что, в ассоциированном с РС локусе 8q24.21, где расположены гены *MYC* и *PVT1*, картированы также гены, кодирующие микроРНК, а именно *MIR1204*, *MIR1205*, *MIR1208* и *MIR3686*. Эти данные, скорее всего, свидетельствуют о важной роли эпигенетической регуляции в патогенезе РС.

Сочетанные ассоциации РС с несколькими полиморфными участками

Анализ ассоциаций РС с сочетанной встречаемостью аллелей различных генов-кандидатов остается относительно неразработанным направлением исследований генетической предрасположенности к РС. В основном исследовали совместный вклад аллелей двух генов, т.к. анализ ассоциаций большего количества генов с заболеванием требует сложных статистических расчетов. Самым распространенным способом анализа являлось разделение больных и здоровых на подгруппы по принципу носительства/неносительства той или иной группы аллелей гена *DRB1* HLA класса II (чаще всего *DRB1*15*), позволяющее выявить сочетанную ассоциацию исследуемого гена с *DRB1* или с включающим этот ген протяженным гаплотипом.

Недавно разработан новый биоинформатический подход, который основан на методе Монте-Карло Марковскими цепями (MCMC) и осуществляет поиск наиболее сильно ассоциированных с заболеванием сочетаний аллелей/генотипов анализируемых полиморфных участков. Алгоритм разработан таким образом, чтобы идентифицировать генетические факторы риска как минимальные множества аллелей. Под этим понимается, что добавление в такое множество каких-либо дополнительных аллелей не увеличивает значимости его ассоциации с РС, а любое подмножество этого множества характеризуется меньшей значимостью ассоциации с РС. С помощью этого метода выявлены два триаллельных сочетания, предрасполагающие к развитию РС у русских. Важно, что носители этих сочетаний входят в непересекающиеся подгруппы одной выборки, что является прямым доказательством генетической гетерогенности РС. При исследовании предрасположенности к РС с помощью другого непараметрического подхода, метода уменьшения многофакторной размерности (multifactor dimensionality reduction, или MDR),

также направленного на выявление сочетаний генов, влияющих на риск заболевания, выявлены сочетания аллелей, соответствующие одно-, двух-, трех- и четырехлокусным моделям взаимодействия генов при формировании генетического риска РС. Однако, только одно биаллельное сочетание отвечало требованиям минимального РС-ассоциированного аллельного множества. Данные по ассоциации РС с минимальными сочетаниями аллелей генов-кандидатов приведены в **таблице 4**.

Таблица 4. Выявленные сочетания аллелей генов-кандидатов, значимо ассоциированные с РС ($p < 0.05$).

Гены, сочетания аллелей которых значимо ассоциированы с РС*	Этническая принадлежность/ Национальность	Число исследований
<i>TCRβ, DRB1</i>	немцы, австралийцы	2
<i>TGFβ1, DRB1</i>	Американцы	1
<i>CCR5, DRB1</i>	Русские	1
<i>MBP, DRB1</i>	русские, итальянцы	1
<i>IL4R, DRB1</i>	Американцы	1
<i>ICAM1, DQB1</i>	финны, испанцы	1
<i>CTLA4, DRB1</i>	французы, китайцы	2
<i>CTLA4, TGFβ1, DRB1</i>	русские	1
<i>CTLA4, TNF</i> (два несцепленных аллеля этого гена)	Русские	1
<i>CTLA4, IL1ra</i>	Сербы	1
<i>UGB, C5</i>	белые американцы европейского происхождения	1
<i>PAII, TPA</i>	Словенцы	1

Продукты исследованных генов: *DRB1* и *DQB1* – гены HLA класса II; *TGFβ1* – трансформирующий ростовой фактор бета1; *UGB* – утероглобин (секреторный белок клеток Клара), *C5* – C5 компонент комплемента, *TPA* - тканевой активатор плазминогена. Продукты остальных генов приведены в таблице 2.

Семь из 12 представленных в **таблице 4** сочетаний несут различные аллели гена *DRB1*, но это во всех случаях не независимый фактор риска РС – аллель *DRB1*15*. Четыре сочетания включают аллели гена *CTLA4*, 2 – гена *TGFβ1*, а сочетания аллелей генов *TCRβ* и *DRB1*, а также *CTLA4* и *DRB1*, выявлены в двух независимых исследованиях. Интересно, что одно из обнаруженных триаллельных сочетаний несет два несцепленных аллеля разных полиморфных участков одного гена (*TNF*). Носительство одного (или обоих) аллеля/ей из предрасполагающих биаллельных сочетаний по отдельности было недостаточным для преодоления порога значимости. Таким образом, анализ сочетаний генов может обеспечивать большую статистическую мощьность при выявлении генов предрасположенности к РС.

Эффект сочетания на риск заболевания может определяться или аддитивностью вклада отдельных генов, или ген-генными (белок-белковыми) взаимодействиями метаболических

путей. Среди представленных данных, судя по всему, реализуются обе возможности.

В пользу аддитивного эффекта отдельных генов в составе сочетаний говорит хорошая сходимость представленных в таблице 4 данных с результатами исследований, выявивших ассоциации одиночных генов на других этнических группах и выборках. С другой стороны, как видно из данных таблицы 4, ассоциированные с РС сочетания могут включать гены, продукты которых входят в один биохимический путь. Так, ген *TPA* из сочетания, выявленного у словенцев, кодирует тканевой активатор плазминогена, а второй ген сочетания, *PAII* – основной ингибитор этой сериновой протеиназы; в результате модулируемая функциональным генетическим полиморфизмом экспрессия этих генов может приводить к нарушениям фибринолиза, характерным для РС. В других случаях продукты генов, входящих в отдельные ассоциированные с РС сочетания, могут формировать белковую сеть, вовлеченную в формирование воспаления.

Поиск сочетаний генов, формирующих генетическую предрасположенность к РС, был также проведен, опираясь на результаты одного из GWAS-анализов предрасположенности к РС, проведенного в лаборатории S. E. Baranzini в 2009 г. Исходя из предположения, что в ряде случаев, по причине незначительного вклада отдельных генов в развитие РС, GWAS дает ложно-отрицательные результаты, провели анализ ассоциации с заболеванием сочетаний генов, белковые продукты которых вовлечены в один метаболический путь. Провели поиск фрагментов известных генных сетей, содержащих большую пропорцию генов, ассоциированных с РС, чем может ожидаться случайно, и выявили несколько «подсетей», связанных с клеточной адгезией, взаимодействием между клетками и передачей сигнала, которые формируют единый иммунный модуль. В полном соответствии со сложившимися генетическими представлениями, в нем отчетливо выделяются гены, входящие в локус HLA. Сверхпредставленными также оказались гены «подсетей», относящихся к нервной системе, а именно сетевых фрагментов, ответственных за направленный рост аксона (axon guidance) и синаптическую передачу между нейронами.

Будущее покажет, насколько продуктивны описанные в этом разделе подходы. Однако, очевидно, что для полигенных заболеваний, обусловленных вкладом независимо действующих и/или взаимодействующих полиморфных вариантов ряда генов, каждый из которых определяет относительно небольшой эффект, ключ к проблеме генетической предрасположенности предстоит искать, анализируя сочетанный вклад различных генов («генных ансамблей»).

Генетический полиморфизм и клиническое течение РС

Будучи хроническим заболеванием, РС характеризуется значительным разнообразием клинического течения, что может отражать генетическую гетерогенность

предрасположенности к разным формам болезни. Выделяют несколько основных форм течения РС. Наиболее распространенной является ремиттирующая форма РС (РРС), при которой обострения сменяются ремиссиями; со временем эта форма переходит во вторично-прогрессирующую форму (ВПРС), характеризующуюся постоянным нарастанием неврологического дефицита с обострениями или без них. У 10-15% больных развивается первично-прогрессирующая форма РС (ППРС), для которой характерно непрерывное нарастание неврологического дефицита с дебюта заболевания. Даже при одной и той же форме РС наблюдается разнообразие клинического течения.

Среди клинических показателей, варьирующих у больных РС, в первую очередь отмечают возраст дебюта, клинические симптомы, характеризующие дебют заболевания, скорость прогрессирования заболевания, длительность ремиссий и обострений, частоту и тяжесть обострений. Болезнь может протекать в мягкой форме: мягкий (benign) РС, а может приводить к смерти в течение года: злокачественный (malignant) РС. Поэтому возможность прогнозировать дальнейший характер течения РС у отдельного больного является одной из важнейших задач современной медицины.

Исследования последних лет показывают, что генетические факторы действительно влияют на клиническое течение заболевания. Так, наблюдается корреляция возрастов дебюта РС у родственников, которая тем сильнее, чем ближе степень родства больных. У больных РС сибсов наблюдается сходство форм и течения РС, сходная степень прогрессирования и инвалидизации. Эти и подобные наблюдения показали перспективность изучения связи между характером клинического течения РС и генетическим полиморфизмом генов-кандидатов.

В **таблице 5** представлены гены, для полиморфных участков которых не менее чем в двух независимых исследованиях найдены значимые ассоциации при сравнении групп больных, различающихся по характеру течения или степени тяжести РС. Формирование сравниваемых групп больных РС опиралось в разных исследованиях на различные клинические критерии, такие как форма РС, время от дебюта РРС до перехода в ВПРС, время достижения определенного уровня неврологического дефицита (чаще всего по шкале инвалидизации EDSS), степень прогрессирования РС и др.. В последнее время в качестве показателя характера течения РС начали использовать новые критерии - шкалу тяжести РС (Multiple Sclerosis Severity Score, MSSS) и показатели магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Таблица 5. Гены, для которых не менее чем в двух независимых исследованиях найдены значимые ассоциации при сравнении групп больных, различающихся по характеру течения или степени тяжести РС.

Ген	локализация гена	белковый продукт	число исследований	
			не найдено ассоциаций	найлены ассоциации
<i>IL-10</i>	1q31-q32	интерлейкин 10	4	3
<i>IL-1ra</i>	2q14.2	антагонист рецептора интерлейкина 1	5	6
<i>IL-1b</i>	2q14	интерлейкин 1b	7	3
<i>CTLA4</i>	2q33	ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4	7	4
<i>CCR5</i>	3p21	рецептор СС-хемокинов 5	7	6
<i>OPN</i>	4q21-q25	остеопонтин	2	2
<i>IL-4</i>	5q31.1	интерлейкин 4	4	2
<i>GR</i>	5q31.3	глюкокортикоидный рецептор	-	2
<i>HLA</i>	6p21.3	лейкоцитарный антиген человека	20	27
<i>TNF</i>	6p21.3	фактор некроза опухолей (ФНО альфа)	6	3
<i>CD24</i>	6q21	поверхностный антиген В-лимфоцитов и гранулоцитов CD24	1	3
<i>VDR</i>	12q12-q14	рецептор витамина D	2	2
<i>RANTES</i>	17q11.2-q12	СС-хемокин-5 (CCL5)	-	2
<i>TGFBI</i>	19q13	трансформирующий ростовой фактор бета 1	1	2
<i>APOE</i>	19q13	аполипопротеин E	22	14

В качестве первых кандидатов для анализа влияния на клиническое течение РС рассматривали, исходя из их роли в развитии РС, гены HLA. Полученные результаты многочисленны, но неоднозначны (таблица 5). В некоторых исследованиях, проведенных для различных этносов, не было выявлено влияния генов HLA на течение РС; в других работах наблюдали значимые различия между группами пациентов с различным клиническим течением РС в частотах аллелей *DRB1*02(15)* (гаплотип DR2) или *DRB1*03(17)* (гаплотип DR3). Как отмечено выше, носительство именно этих групп аллелей ассоциировано с предрасположенностью к РС во многих этносах (см. таблицу 1).

Сведения о том, связано ли носительство этих групп аллелей с благоприятным или, напротив, неблагоприятным клиническим течением РС, противоречивы. Однако, в нескольких работах, проведенных в последние годы на обширных выборках в различных этнических группах, показано, что носительство гаплотипа DR2 (аллеля *HLA-DRB1*15*) ассоциировано с более тяжелым течением РС. Наблюдаемые противоречия могут быть объяснены тем, что, как и в случае предрасположенности к РС, аллели других генов локуса

HLA одновременно с HLA-DRB1 вносят свой независимый вклад в формирование клинической картины у больных РС, что и было недавно показано для HLA-DRB5. В то же время большую роль могут играть сложные взаимодействия различных аллелей DRB1 на разных хромосомах, что выявлено для аллеля HLA-DRB1*01, протективный эффект которого в отношении тяжести РС значим только когда этот аллель входит в генотип HLA-DRB1*15 / HLA-DRB1*01.

В отличие от ситуации с генами HLA, исследования, направленные на выяснение вклада других генов-кандидатов в клиническое течение РС, в основном немногочисленны (таблица 5). Большинство из генов, ассоциированных с фенотипическими проявлениями РС, является также и факторами риска РС. В первую очередь в эту группу входят гены, продукты которых участвуют в развитии иммунного ответа: гены цитокинов (*IL-10*, *IL-1ra*, *IL-1b*, *OPN*, *IL-4*, *TNF*, *TGFB1*), костимулирующих молекул и рецепторов лимфоцитов (*CTLA4*, *CD24*), хемокинов и их рецепторов (*CCR5*, *RANTES*). На клиническое течение РС, как и на предрасположенность к нему, могут также оказывать влияние аллельные варианты генов, кодирующих рецептор витамина D (*VDR*) и аполипопротеин E (*APOE*). Аполипопротеин E (апоЕ) участвует в регенерации аксонов и миелина после повреждения тканей центральной и периферической нервной систем. Недавно было показано, что апоЕ также участвует в презентации молекулами CD1 сывороточных липидных антигенов специфическим Т-клеткам. Примечательно, что практически во всех работах, где выявлена связь *APOE* с тяжестью РС, аллель эpsilon-4 был ассоциирован с тяжелым течением РС, а аллель эpsilon-2 – с более благоприятным исходом.

Единственный ген, для которого была найдена ассоциация только с клиническим течением РС - ген *GR*, кодирующий глюкокортикоидный рецептор. В недавней работе на большой выборке больных РС из Голландии было показано, что более агрессивное течение РС связано с носительством гаплотипа 6 (TthIII, ER22/23ЕК, 9beta) этого гена. Этот эффект может быть обусловлен аллелем ER22/23ЕК, который определяет сниженную чувствительность к кортикостероидам. Поскольку кортикостероиды играют важную роль в контроле хронических воспалительных заболеваний, пониженная чувствительность к ним у некоторых пациентов с РС может приводить к потере контроля над развитием воспаления в ЦНС и, как следствие, к более тяжелому течению РС.

Сопоставление представленных в таблице 5 сведений о числе исследований, в которых связь между тем или иным генетическим полиморфизмом и клиническим течением РС была обнаружена, с числом исследований, в которых она не была обнаружена, говорит о преждевременности однозначных заключений на данном этапе. Это связано как с постановкой проведенных исследований (небольшими выборками исследованных групп

больных и использованием разных характеристик клинического исхода), так и со сложной картиной исследуемого явления (генетической гетерогенностью РС, даже при одной форме РС, и с высокой вероятностью влияния многих генов на течение РС).

Недавно был проведен первый полногеномный поиск ассоциаций с клиническими характеристиками РС методом GWAS. Исследование выполнено с использованием ДНК-микрочипа фирмы Illumina, USA, включающего 551.642 однонуклеотидных полиморфизмов на 794 больных РРС и ВПРС, на которых параллельно был проведен анализ предрасположенности к РС. В качестве критериев для такого анализа корреляций между генотипом и фенотипом использовали степень тяжести РС, оцениваемую по шкале MSSS, показатели МРТ и возраст дебюта РС. В список генов, значимо ассоциированных с различными фенотипическими характеристиками РС ($p \leq 10^{-5}$), вошло более 60 генов. Неожиданным оказалось то, что в этом списке практически нет генов, продукты которых участвуют в иммунном ответе. Исключением является ген *NALp11*, участвующий в реакциях врожденного иммунитета, для которого обнаружена ассоциация с тяжестью РС по шкале MSSS. Сравнительный анализ функциональной принадлежности генов, ассоциированных с развитием РС и с клиническими характеристиками заболевания, также выявил их функциональную дихотомию.

В целом, накопленные данные о связи генетического полиморфизма с фенотипическими проявлениями РС не позволяют сделать однозначных заключений об участии отдельных генов в формировании клинического течения заболевания. Возможно, успехов на этом пути следует ожидать при анализе совместного вклада нескольких генов в патогенез этого полигенного заболевания. Выявление определенных генов-модификаторов заболевания (disease modifying genes), аллельные варианты которых в совокупности определяют различия в клиническом течении РС, может помочь в обособлении групп больных со сходным течением РС и, тем самым, в выборе лекарственной терапии.

Генетические исследования на экспериментальных моделях РС

Преимуществом этого подхода является возможность свести к минимуму различия в условиях внешней среды, снижение генетической гетерогенности за счет использования инбредных линий и в принципе неограниченные размеры исследуемых когорт, что важно для достижения адекватной статистической значимости. Установлено, что развитие у грызунов заболевания, моделирующего РС, а именно экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЭАЭ), зависит, как и развитие РС у людей, от генов HLA классов I и II и регулируется более чем 100 генами, каждый из которых обеспечивает слабый эффект.

Новые возможности открывают исследования на трансгенных гуманизированных

моделях. Ранее было показано, что когда у мышей присутствуют молекулы HLA *DR* класса II человека совместно с Т-клеточным рецептором человека, специфичным для основного белка миелина (МВР), у них развивается ЭАЭ. Используя такую систему, экспрессировали у мышей, порознь и вместе, соседние гены HLA класса II человека *DR2b* и *DR2a*, всегда наследуемые вместе, т.е. входящие в один гаплотип. Трансгенез одного *DR2b* приводил к спонтанному развитию тяжелого ЭАЭ, а при совместном введении двух этих генов тяжесть заболевания уменьшалась, его дебют откладывался, и заболевание протекало по типу ремиттирующего течения РС у людей. Эти данные свидетельствуют о функциональном эпистазе продуктов генов, локализованных внутри общего ГКГ-гаплотипа, ассоциированного с РС.

В целом, данные о генетической предрасположенности к РС, полученные на экспериментальных моделях, совпадают с данными генетики человека и развивают их.

Заключение

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что РС является заболеванием полигенной природы, характеризующимся генетической гетерогенностью, которая, скорее всего, отражает разную этиологию клинических форм заболевания. Болезнь возникает вследствие независимого либо эпистатического действия множества генов (в первую очередь, входящих в систему HLA), каждый из которых вносит небольшой вклад в развитие заболевания. В силу этих причин вопрос о факторах генетической предрасположенности к РС, несмотря на многочисленные усилия исследователей и очевидные успехи последних лет, далек от своего разрешения.

В то же время, данные о генетике РС позволили более полно понять возможные молекулярные механизмы, участвующие в патогенезе РС. Важным итогом этих исследований может быть обнаружение новых мишеней для терапии РС. Например, тот факт, что большая группа белков участвует в пути NF-κB, должен инициировать поиск белков-мишеней именно в этом сигнальном пути.

Помимо выявления молекулярных основ патогенеза РС, критичных для разработки новых методов профилактики и лечения этого заболевания, важной целью генетических исследований для РС является идентификация генетических факторов риска, применимых для индивидуального прогноза предрасположенности к РС по результатам генотипирования. Эта задача пока не решена. Среди факторов, обусловивших отсутствие впечатляющего эффекта от применения как подхода «ген-кандидат», так и GWAS для предсказания генетической предрасположенности к РС, следует назвать недостаточно высокую воспроизводимость результатов, наблюдаемую как в различных исследованиях. Это может

быть связано с тем, что высокие требования к значимости результатов все равно не полностью предотвращают появление ложноположительных результатов, но, в то же время, могут отсеять некоторые истинные ассоциации по причине недостаточной для их выявления статистической мощности исследования. Еще один из аспектов проблемы стал ясен после завершения в 2012 г. проекта ENCODE, ориентированного на расшифровку функциональной части генома. Публикация, объявившая миру о его успешном завершении, содержала, в частности, утверждение, что 80.4% генома имеет функциональное значение, т.е. участвует, по крайней мере, в одном биологическом процессе хотя бы в одном типе клеток. Из этого следует, что для понимания природы РС может оказаться недостаточным традиционный анализ ассоциации заболевания с аллельными вариантами, расположенными в белок-кодирующих областях генома, на долю которых у человека приходится около 1.5% всего генетического материала, или рядом с ними, и важна расшифровка других областей генома. При этом наиболее существенными представляются те области генома, которые, с одной стороны, переменны, а с другой, их минорные варианты достаточно часто (> 1%) встречаются в популяции.

