

Первые результаты объединенного общероссийского исследования по клинической генетике рассеянного склероза

Е.А. СОКОЛОВА^{1*}, Н.А. МАЛКОВА², Д.С. КОРОБКО², А.С. РОЖДЕСТВЕНСКИЙ³, А.В. КАКУЛЯ⁴,
Е.В. ХАНОХ⁵, Р.А. ДЕЛОВ³, Ф.А. ПЛАТОНОВ^{6,7}, Т.Е. ПОПОВА⁷, Е.Г. АРЕФЬЕВА⁸, Н.Н. ЗАГОРСКАЯ⁸,
В.М. АЛИФИРОВА⁹, М.А. ТИТОВА⁹, И.В. СМАГИНА^{10,11}, С.А. ЕЛЬЧАНИНОВА¹¹, А.В. ПОПОВЦЕВА¹¹,
Ю.Н. ЛИЧЕНКО¹⁰, М.А. ДЫМОВА¹, А.С. ВАЙНЕР^{1,12}, О.В. ПЬЯНКОВА^{1,12}, И.П. ОСКОРБИН^{1,12},
А.А. КЕЧИН^{1,12}, В.П. ПУЗЫРЕВ¹³, О.Г. КУЛАКОВА¹⁴, Е.Ю. ЦАРЕВА¹⁴, О.О. ФАВОРОВА¹⁴, С.Г. ШУР^{14,15},
Н.Ю. ЛАШ^{14,15}, Н.Ф. ПОПОВА^{14,15}, Е.В. ПОПОВА^{14,15}, Е.И. ГУСЕВ^{14,15}, А.Н. БОЙКО^{14,15},
Ю.С. АУЛЬЧЕНКО^{1,16}, М.Л. ФИЛИПЕНКО¹

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, Новосибирск; ²Областной центр рассеянного склероза, Государственная новосибирская областная клиническая больница, Новосибирск; ³Омская государственная медицинская академия; ⁴Омская областная клиническая больница; ⁵Клинический диагностический центр, Омск; ⁶Республиканская больница №2, Якутск; ⁷Медицинский институт Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова, Якутск; ⁸Кемеровская областная клиническая больница; ⁹Сибирский государственный медицинский университет, Томск; ¹⁰Краевая клиническая больница, Барнаул; ¹¹Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул; ¹²Новосибирский государственный университет; ¹³Научно-исследовательский институт медицинской генетики Сибирского отделения РАН, Томск; ¹⁴кафедра неврологии и нейрохирургии и кафедра молекулярной биологии и биотехнологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Москва; ¹⁵Московский городской центр рассеянного склероза (на базе городской клинической больницы №11); ¹⁶Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск

The first results of a combined all-Russian study on clinical genetics of multiple sclerosis

E.A. SOKOLOVA, N.A. MALKOVA, D.S. KOROBKO, A.S. ROZHDESTVENSKY, A.V. KAKULYA, E.V. KHANOKH,
R.A. DELOV, F.A. PLATONOV, T.E. POPOVA, E.G. AREF'YEV, N.N. ZAGORSKAYA, V.M. ALIFIROVA, M.A. TITOVA,
I.V. SMAGINA, S.A. ELCHANINOVA, A.V. POPOVTSEVA, YU.N. LICHENKO, M.A. DYMOVA, A.S. VAINER,
O.V. P'YANKOVA, I.P. OSKORBIN, A.A. KECHIN, V.P. PUZYRYOV, O.G. KULAKOVA, E.YU. TSAREVA,
O.O. FAVOROVA, S.G. SHCHUR, N.YU. LASHCH, N.F. POPOVA, E.V. POPOVA, E.I. GUSEV, A.N. BOYKO,
YU.S. AULCHENKO, M.L. FILIPENKO

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk; Regional Center of Multiple Sclerosis, Novosibirsk, Regional Hospital, Novosibirsk; Omsk State Medical Academy, Omsk; Omsk Regional Hospital, Omsk; Clinical Diagnostic Center, Omsk; Republican Hospital №2, Yakutsk; Amosov Medical Institute of Northeast Federal University, Yakutsk; Kemerovo Regional Hospital, Kemerovo; Siberian State Medical University, Tomsk; Krai Hospital, Barnaul; Altay State Medical University, Barnaul; Novosibirsk State University, Novosibirsk; Research Institute of Medical Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk; Pirogov Russian Research Medical University, Moscow; Moscow City Multiple Sclerosis Center, Moscow; Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Рассеянный склероз (РС) является классическим мультифакториальным заболеванием, в этиологии которого важную роль играет взаимодействие внешних факторов и особенностей структуры большого количества генов. Выявление факторов риска развития РС и создание комплексной модели патогенеза — актуальные задачи неврологии. Выявление истинных факторов риска возможно только в исследованиях с достаточным уровнем статистической мощности и как следствие с большим объемом выборки. В статье на примере данных об ассоциации полиморфных локусов гена *CD40* и РС у жителей Российской Федерации продемонстрирована необходимость объединения данных разных исследователей-клиницистов для повышения мощности исследования.

Ключевые слова: рассеянный склероз, мощность исследования, ассоциация, фактор риска, *CD40*.

Multiple sclerosis is a classic multifactorial disease in which etiology interaction of external factors and structural features of a large number of genes plays an important role. Identifying risk factors for multiple sclerosis and creating an integrated model of pathogenesis are urgent tasks of neurology. Revealing true risk factors is possible only in studies with sufficient statistical power, so with a large amount of samples. We conducted the association study of *CD40* gene's polymorphisms and multiple sclerosis among residents of the Russian Federation. The results demonstrated the need to combine data from different researchers in clinical studies to increase the power of the study.

Key words: multiple sclerosis, power of study, association, factor risk, *CD40*.

Рассеянный склероз (РС) — тяжелое заболевание нервной системы, характеризующееся разрушением миелиновой оболочки, хроническим воспалением, патологическими изменениями аксонов и олигодендроцитов и прогрессирующей неврологической дисфункцией. РС считается заболеванием мультифакториальной природы. В его этиологии большую роль играет взаимодействие внешних факторов и особенностей структуры большого количества генов, каждый из которых вносит незначительный вклад в реализацию заболевания. Выявление факторов риска развития РС, к числу которых относятся и генетические факторы, может осуществляться в рамках эпидемиологических исследований.

Для изучения заболеваний, встречающихся в популяции с низкой частотой, таких как РС, наиболее часто используются эпидемиологические исследования по дизайну «случай—контроль». Одним из ключевых звеньев поиска факторов риска при проведении эпидемиологических исследований является корректная интерпретация результатов. После статистической обработки данных получают два параметра — «отношение шансов» (OR) и его уровень статистической значимости (*p*-value или просто *p*). В терминах клинической практики OR характеризует шанс попасть в группу больных («случаев»), при условии носительства индивидуумом аллеля риска. Точность этой оценки зависит от многих параметров, например размера выборки. По этой причине кроме расчета OR обычно вычисляют доверительный интервал (95% CI, confidence interval) и уровень значимости (*p*). Принято считать результаты с $p < 0,05$ статистически значимыми; чем меньше значение *p*, тем выше уровень доверия к полученным результатам. Только в случае статистически значимого *p* допустима интерпретация величины OR.

Важным этапом оценки качества результатов проведенного исследования является также оценка его мощности. Мощность исследования, а точнее мощность статистического анализа результатов исследования, характеризует вероятность того, что мы увидим реально существующую ассоциацию в спланированном исследовании. Мощность исследования выражается в процентах. Приемлемым уровнем принято считать 80% и более. Мощность исследования зависит от многих параметров: распространенность заболевания в популяции, частота исследуемого полиморфного локуса, степень связи полиморфного локуса с заболеванием, размер исследуемых групп. Чем слабее связь полиморфного локуса с заболеванием, тем большего размера группы требуются для достижения приемлемой мощности. Например, если распространенность заболевания 0,001 (1 случай на 1000 человек), частота аллеля риска полиморфного локуса 0,3, то для того чтобы с мощностью 80% и уровнем статисти-

стической значимости 0,05 выявить ассоциацию с $OR > 1,25$, необходимо сформировать группу больных и контрольную группу численностью не менее 900 человек каждая. Более слабые ассоциации ($OR < 1,25$) по результатам такого исследования, скорее всего, будут не выявлены.

Таким образом, учитывая многофакторную природу РС, для успешного проведения эпидемиологического исследования необходимы группы пациентов с РС и контрольная не менее 900 человек каждая. Вследствие низкой частоты заболевания в популяции выборки такого размера можно сформировать только в рамках объединенного общероссийского исследования. В настоящее время получены первые результаты подобного исследования, подтверждающие необходимость объединения данных разных исследователей-клиницистов для повышения мощности исследования.

Материал и методы

В группу пациентов с РС вошли 1684 человека, 1124 женщины и 560 мужчин (средний возраст — $36,7 \pm 11,2$ года).

У 1176 человек был ремиттирующий тип (РРС), у 73 — первично-прогрессирующий тип (ППРС), у 403 — вторично-прогрессирующий тип течения заболевания (ВПРС), у 22 пациентов — дебют, у 10 — клинически изолированный синдром (КИС).

Пациентов обследовали на базе следующих учреждений: Московский городской центр рассеянного склероза (на базе Городской клинической больницы №11) — 508 человек; Омская областная клиническая больница — 305; Кемеровская областная клиническая больница — 224; кафедра неврологии и нейрохирургии Сибирского государственного медицинского университета, Томск — 152; Краевая клиническая больница, Барнаул — 146; Государственная новосибирская областная клиническая больница — 248; Республиканская больница №2, Якутск — 101.

Диагноз РС ставился согласно критериям Мак-Дональда [3] в версии 2001 г.

В контрольной группе были 879 человек (346 мужчин и 533 женщины, средний возраст $33,0 \pm 12,0$ лет) без воспалительных заболеваний центральной нервной системы. Они проживали в Новосибирске — 576 человек, Барнауле — 118, Москве — 112, Якутске — 60 и Омске — 22.

Исследование было одобрено этическими комитетами перечисленных учреждений. Все пациенты и лица, вошедшие в контрольную группу, подписывали информированное согласие на участие в эксперименте.

Для молекулярно-генетического исследования ДНК выделяли из венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделе-

ние и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК смесью фенола с хлороформом и осаждение ДНК этанолом. Генотипирование полиморфных локусов rs6074022, rs1883832, rs1535045 и rs11086996 проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов. Это исследование было выполнено в Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (Новосибирск).

Тесты на соблюдение равновесия Харди—Вайнберга проводили с помощью программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия; <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Ассоциацию генотипа с РС исследовали с помощью логистического регрессионного анализа (функция «glm» статистического пакета R, www.r-project.org). Статистическую мощность исследования вычисляли с помощью программы Genetic Power Calculator (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>).

Результаты и обсуждение

В 2009 г. по результатам полногеномного исследования была выявлена ассоциация РС и полиморфного локуса rs6074022 хромосомы 20q13 расположенного выше гена *CD40* [5]. Ранее ассоциация полиморфных локусов гена *CD40* была установлена с рядом таких аутоиммунных заболеваний, как системная красная волчанка [6], ревматоидный артрит [4], болезнь Крона [1], болезнь Грейвса [2]. Важная роль гена *CD40* в развитии аутоиммунного процесса показана на модельной линии мышей К/ВхN, у которых спонтанно развивается ревматоидный артрит. Нокаутные по гену *CD40* мыши (К/ВхN-CD40-/-) не страдают от ревматоидного артрита. Ассоциация РС и полиморфного локуса rs6074022 гена *CD40* согласуется с аутоиммунной природой заболевания. Однако приводимые здесь данные были получены на жителях Австралии, Великобритании и Новой Зеландии, и они требуют верификации в других странах.

Для исследования ассоциации с РС были выбраны 4 полиморфных локуса: rs6074022, rs1883832, rs1535045, rs11086996. Два полиморфных локуса,

rs6074022 и rs1883832, лежат выше старта транскрипции гена, rs1535045 — в интроне гена и rs11086996 — в экзоне. Генотипы всех полиморфных локусов были определены у пациентов с РС и в контрольной группе. Эффективность генотипирования составила $\geq 99,9\%$ для каждого полиморфного локуса. Пять пациентов были исключены из дальнейшего анализа из-за отсутствия результатов генотипирования. Распределение генотипов статистически значимо не отличалось от равновесия Харди—Вайнберга для всех исследованных полиморфных локусов. Наличие ассоциации полиморфных локусов с РС исследовалось с помощью логистического регрессионного анализа (табл. 1). Два полиморфных локуса статистически значимо ассоциированы с РС: rs6074022 (С аллель OR=1,27, 95%CI=[1,12—1,45], $p=3 \cdot 10^{-4}$) и rs1883832 (Т аллель OR=1,20, 95%CI=[1,05—1,38], $p=7 \cdot 10^{-3}$). Согласно критерию Акаике, для обоих полиморфных локусов аддитивная модель наследования лучше описывала ассоциацию. Достигнутая мощность исследования превышает 80% для обоих полиморфных локусов и свидетельствует о том, что выявленные ассоциации не являются ложноположительными.

Предположим, что исследование проводилось одновременно в двух разных местах на выборках из жителей РФ, но меньшего объема, например в Москве, Сибирском федеральном округе и Республике Саха (СФО и РС). Данное обстоятельство потенциально могло бы повлиять на результаты (табл. 2). В группе жителей СФО и РС будет выявлена ассоциация трех полиморфных локусов: rs6074022 (С аллель OR=1,25, 95%CI=[1,08—1,45], $p=3 \cdot 10^{-3}$, мощность 84%), rs1883832 (Т аллель OR=1,18, 95%CI=[1,03—1,39], $p=0,02$, мощность 58%) и rs1535045 (Т аллель OR=0,85, 95%CI=[0,73—0,98], $p=0,03$, мощность 8%). Однако пороговая мощность в 80% будет преодолена только для rs6074022, следовательно, только эту ассоциацию следует считать истинно положительной. В группе участников из Москвы при этом выявлена всего одна ассоциация с РС — rs6074022 с уровнем мощности, не превышающим порогового значения (С аллель OR=1,45, 95%CI=[1,03—2,05], $p=0,03$, мощность 56%). Таким образом, истинная ассоциация полиморфных локусов с РС при недостаточной мощности исследования может быть как обнаружена по результатам ис-

Таблица 1. Ассоциация РС и полиморфных локусов гена *CD40*

Локус	Частота редкого аллеля в контрольной группе	Редкий аллель	OR, 95%CI, p	Мощность исследования*, %
rs6074022	0,24	С	1,27 [1,12—1,45], $p=0,0003$	94
rs1883832	0,22	Т	1,20 [1,05—1,38], $p=0,007$	93
rs1535045	0,26	Т	0,96 [0,84—1,09], $p=0,52$	10
rs11086996	0,02	G	0,75 [0,46—1,23], $p=0,26$	25

Примечание. Приводятся результаты логистического регрессионного анализа ассоциации РС и полиморфных локусов гена *CD40*. Для анализа использована аддитивная модель. В качестве аллеля риска для каждого полиморфного локуса был выбран редкий аллель. * — значение реально достигнутой мощности исследования для выявления ассоциации с уровнем значимости $p=0,05$.

Таблица 2. Ассоциация РС и полиморфных локусов гена *CD40* при делении выборки по регионам страны

Регион	Локус	Контрольная группа			РС			OR, 95%CI, <i>p</i>	Мощность исследования, %
Москва	rs6074022	71	33	8	257	206	43	1,45 [1,03—2,05] <i>p</i> =0,03	56
	rs1883832	73	34	5	287	183	36	1,38 [0,96—1,97] <i>p</i> =0,07	63
	rs1535045	63	42	7	286	182	38	1,03 [0,74—1,43] <i>p</i> =0,88	5
	rs11086996	109	3	0	495	11	0	0,80 [0,22—2,92] <i>p</i> =0,73	6
СФО и РС	rs6074022	446	274	47	608	465	100	1,25 [1,08—1,45] <i>p</i> =0,003	84
	rs1883832	459	265	43	640	451	82	1,18 [1,03—1,39] <i>p</i> =0,02	58
	rs1535045	368	300	51	671	423	79	0,85 [0,73—0,98] <i>p</i> =0,03	8
	rs11086996	770	20	0	1145	28	0	0,95 [0,53—1,68] <i>p</i> =0,84	5
Объединенная выборка	rs6074022	517	307	55	865	671	143	1,27 [1,12—1,45] <i>p</i> =0,0003	94
	rs1883832	532	299	48	927	634	118	1,20 [1,05—1,38] <i>p</i> =0,007	93
	rs1535045	481	342	56	957	605	117	0,96 [0,84—1,09] <i>p</i> =0,52	10
	rs11086996	852	27	0	1640	39	0	0,75 [0,46—1,23] <i>p</i> =0,26	25

Примечание. В последней графе использовано значение реально достигнутой мощности исследования для выявления ассоциации с уровнем значимости $p=0,05$.

следования, например ассоциация с rs6074022 выявлена в обеих группах меньшего размера, так и не обнаружена, например, ассоциация rs1883832 в группе жителей Москвы. Об ассоциации rs1535045 с РС никаких выводов сделать нельзя, так как даже в объединенной группе мощность исследования не превышает пороговую.

Важным является тот факт, что частоты встречаемости аллелей как в контрольной группе, так и в группе пациентов с РС между жителями Москвы и СФО и РС статистически значимо не отличаются. Причина различий в получаемых данных обусловлена не генетической гетерогенностью групп, а исключительно случайным набором данных и низкой мощностью исследования.

По результатам всего исследования можно сделать вывод, что полиморфные локусы rs6074022 и rs1883832 ассоциированы с РС. Однако для того чтобы понять, как именно реализуется связь полиморфных локусов гена *CD40* с развитием патологии, необходимо выявить причинный полиморфный локус и механизм его реализации. Выявление причинного полиморфного (-ых) локуса (-ов) в гене *CD40* позволит лучше понять механизм участия в развитии аутоиммунных патологий.

Работа поддержана Российской федеральной программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (2012-1.5-12-000-1002). Государственный контракт №8490.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blanco-Kelly F, Matesanz F et al. CD40: novel association with Crohn's disease and replication in multiple sclerosis susceptibility. PLoS One 2010; 5: 7: 11520.
2. Jacobson E.M., Concepcion E., Oashi T., Tomer Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. Endocrinology 2005; 146: 2684—2691.
3. McDonald W.I., Compston A., Edan G. et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol 2001; 50: 121—127.
4. Orozco G., Eyre S., Hinks A. et al. Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. Ann Rheum Dis 2010; 69: 813—816.
5. The Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. Nat Genet 2009; 41: 824—828.
6. Vazgiourakis V.M., Zervou M.I. et al. A common SNP in the CD40 region is associated with systemic lupus erythematosus and correlates with altered CD40 expression: implications for the pathogenesis. Ann Rheum Dis 2011; 70: 2184—2190.