

На правах рукописи

КОРОБКО ДЕНИС СЕРГЕЕВИЧ

КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

(НА ПРИМЕРЕ ПОПУЛЯЦИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ)

Специальность 14.01.11 - нервные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва-2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Малкова Надежда Алексеевна

Научный консультант:

кандидат биологических наук

Филипенко Максим Леонидович

Официальные оппоненты:

Бахтиярова Клара Закиевна, доктор медицинских наук, профессор, кафедра неврологии и нейрохирургии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Давыдовская Мария Вафаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии и нейрохирургии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «13» мая 2014 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.006.01 при ФГБУ «НЦН» РАМН по адресу: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НЦН» РАМН по адресу: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, 80.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2014 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Е.В. Гнедовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность научного исследования

Рассеянный склероз, являясь одной из главных причин инвалидизации неврологических больных молодого, среднего возраста, приводит к высокому уровню медицинских и немедицинских расходов [Шварц Г.Я., 2001, Бойко А. Н. и др., 2011; Confavreux C., Vukusic S., 2006]. В мире насчитывается около 3 млн. больных РС, в т.ч. в России около 200 тысяч [Гусев Е.И., Бойко А.Н., 2007; Столяров И.Д., 2008; Alcina A. et al., 2008].

На сегодняшний день существует концепция, согласно которой РС – это мультифакториальное аутоиммунное заболевание, характеризующееся потерей миелина, аксональной дегенерацией различной степени и прогрессирующей неврологической дисфункцией [Noseworthy J.H. et al., 2000]. В патогенез РС вносят вклад как факторы окружающей среды, так и наследственность [Гусев Е.И. и др., 1997, Спирин Н.Н. и др., 2003; Андриевский Т.А. и др., 2004; Бахтиярова К.З., 2007; Завалишин И.А. и др., 2011; Compston A., Coles A., 2002; Ebers G.C., 2008,]. Причем, до сих пор не установлена главенствующая роль какого-то одного из факторов [Фаворова О. О. и др., 2009; Barcellos L. F., Thompson G., 2003; Dyment D. A. et al., 2004]. В пользу важного значения наследственной предрасположенности при развитии РС свидетельствует обнаружение семейных форм заболевания, которые составляют от 2 до 20% [Гусев Е. И. и др., 1997; Myhr K. M., Flinstad H.H., 2003]. Генетическая предрасположенность к РС реализуется полигенной системой, ответственной за формирование иммунного ответа [Гусев Е.И., Бойко А.Н. и др., 1999, Завалишин И.А. и др., 2003; Sadovnick A.D., Ebers G.C. et al., 1996; Myhr K. M., Flinstad H. H., 2003, Favorova O.O. et al., 2006; Hafler D.A., 2007; McElroy J.P. et al., 2008]. Регионы сцепления с РС выявлены на всех хромосомах, кроме хромосом 21 и Y, но отмечается гетерогенность в различных этнических группах. Большое значение имеет определенный набор аллелей генов главного комплекса гистосовместимости, располагающегося на шестой хромосоме – область 6p21 [Jersild C. et al., 1973; Ebers G.C., Sadovnick A.D. et al, 1995, Barcellos L.F. et al., 2003; Yeo T.W. et al., 2007]. Согласно результатам полногеномных скринингов (GWAS) обнаружено более 20 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в разных генах, не относящихся к HLA-кластеру, показывающих значительную ассоциацию с развитием у пациента РС [IMSGC, 2007-2012].

Полиморфизмы генов цитокинов традиционно привлекают большой интерес как возможные генетические факторы риска аутоиммунных болезней среди других генов-кандидатов. Участие цитокинов в патогенезе РС многократно показано в экспериментальных исследованиях. Обсуждается роль цитокинов и полиморфных локусов генов цитокинов в развитии различных типов заболевания, скорости прогрессирования, интенсивности

воспалительной реакции и других важных клинико-патогенетических характеристик РС [Alekseenkov A.D., Sudomoina M.V., Voiko A.N., 1998; Myhr K.M. et al., 2003; Kallaur A.P. et al., 2013; Кулакова О.Г., Бойко А.Н. и др., 2004; Бабенко С.А., 2008; Ельчанинова С.А., Смагина И.В. и др., 2009; Какуля А.В. и др., 2012].

Несмотря на большое количество исследований и публикаций по изучению генетики РС, в настоящее время отсутствуют глубокое понимание механизмов, инициирующих развитие заболевания. До сих пор нет какого-то одного достоверного генетического маркера-предиктора для прогнозирования характера течения, клинической активности РС. Все вышеперечисленные положения обуславливают актуальность изучения патогенетической роли полиморфизмов генов цитокинов у больных рассеянным склерозом и послужили основанием для постановки цели исследования.

Цель исследования: оценить роль полиморфизмов генов иммунной системы в предрасположенности к рассеянному склерозу и формировании клинической картины заболевания на примере популяции больных Новосибирской области.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести типирование больных РС и здоровых по полиморфизмам:
 - гена фактора некроза опухолей альфа, *TNF- α* (rs1800629),
 - гена рецептора первого типа фактора некроза опухолей альфа, *TNFRSF1A* (rs4149584),
 - гена клеточного рецептора *CD40* (rs6074022, rs1883832, rs1535045 и rs11086998);
 - гена кинезина 1В, *KIF1B* (rs10492972)
 - rs3135388 (генетический маркер носительства аллеля HLA-DRB1*15).
2. Оценить влияние полиморфизмов генов иммунной системы на риск развития РС в популяции Новосибирской области;
3. Изучить связь отдельных аллелей и генотипов с клиническими характеристиками заболевания (возраст, симптомы дебюта, длительность первой ремиссии, характер течения, скорость прогрессирования), оценить прогностическое значение выявленных ассоциаций для больных РС.
4. Изучить клинико-генетические характеристики семейных случаев РС в сопоставлении со спорадическими. Оценить семейный и общий риск повторяемости РС в популяции больных Новосибирской области.
5. Оценить влияние полиморфных вариантов изученных генов на эффективность иммуномодулирующей терапии.

Научная новизна исследования. Впервые на репрезентативной этнически однородной группе русских, проживающих в Новосибирской области, проведено клинико-генетическое исследование больных рассеянным склерозом с использованием полиморфных локусов генов *TNF- α* , *TNFRSF1A*, *CD40*, *KIF1B*. Впервые создана коллекция образцов ДНК больных РС в Новосибирской области. Дополнена информация о вкладе

полиморфизма гена *CD40* в формирование наследственной предрасположенности к заболеванию. Обнаружены маркеры повышенного риска развития РС у жителей Новосибирской области. Впервые определено прогностическое значение носительства отдельных аллельных вариантов изученных полиморфизмов генов *CD40*, *TNF-α* и полиморфизма rs3135388 в отношении клинических особенностей заболевания (скорость прогрессирования, тип течения, среднегодовое количество обострений) и ответа на иммуномодулирующую терапию. Описаны семейные случаи РС в Новосибирской области. Установлены клинико-генетические особенности и прежде всего, более мягкое, доброкачественное течение семейного РС с отсутствием прогрессирующих форм в Новосибирской области.

Теоретическая значимость работы. Результаты, полученные в ходе данного клинико-генетического исследования, имеют фундаментальное значение, способствуют уточнению региональных особенностей генетических факторов риска РС, детализации определенных аспектов этиопатогенеза РС (роли полиморфизмов генов иммунной системы в развитии генетической предрасположенности к РС) и могут послужить основой для последующих исследований по генетике РС. Выявленные данные о влиянии генетических факторов на фенотипическую экспрессию РС способствуют пониманию закономерностей течения РС, включая такие ключевые параметры как скорость прогрессирования и частоту обострений заболевания.

Практическая значимость работы. Результаты данной работы могут быть использованы при проведении профилактических мероприятий в семьях пациентов РС и оценки предрасположенности к заболеванию у лиц, имеющих случаи РС у кровных родственников. Выявленные данные об ассоциациях аллельных вариантов полиморфизмов с клиническими характеристиками РС и ответом на терапию ПИТРС дадут возможность специалистам использовать их в качестве дополнительных прогностических факторов, что будет способствовать совершенствованию дифференцированного, индивидуального подхода к выбору медикаментозной терапии при ведении различных групп пациентов с РС. Также полученные данные создают основу для разработки фармакогеномного подхода при РС с определением терапевтической эффективности и рефрактерности при данном заболевании. Результаты исследования могут быть рекомендованы для учебно-методического процесса в ВУЗах в курсах неврологии, общей и медицинской генетики, на факультете последипломного образования.

Внедрение результатов в практику. В ходе проведения исследования создан банк ДНК больных РС Новосибирской области. Результаты молекулярно-генетического анализа рекомендованы к использованию в Медико-генетической консультации ГБУЗ НСО «Государственный Новосибирский областной клинический диагностический центр», для прогнозирования риска развития РС, прежде всего у пациентов с отягощенным семейным анамнезом. Результаты исследования внедрены в

учебно-педагогический процесс кафедры неврологии и клинической алгологии ФПК и ППВ ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ.

Апробация работы: Результаты диссертационного исследования представлены и обсуждены на V Сибирской межрегиональной научно-практической конференции «Рассеянный склероз: 30 лет спустя» (Новосибирск, 2011), 12-й межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии» с обсуждением смежных вопросов неврологии и медицинской генетики (Новосибирск, 2012), X Всероссийском съезде неврологов с международным участием (Нижний Новгород, 2012), VIII Международной конференции «Биоинформатика регуляции и структуры генома/ Системная биология» (Новосибирск, 2012), VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции «Рассеянный склероз и другие аутоиммунные заболевания нервной системы» (Новосибирск, 2013), международных конгрессах: 16th Congress of the European Federation of Neurological societies (Стокгольм, Швеция, 2012), 28th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (Лион, Франция, 2012), 23rd Meeting of the European Neurological society (Барселона, Испания, 2013). Диссертационная работа апробирована и рекомендована к защите 27 мая 2013 года на расширенном заседании кафедры клинической неврологии и алгологии ФПК и ППВ ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава РФ.

На Первом конгрессе Российского Комитета исследователей рассеянного склероза (РОКИРС, г. Казань, сентябрь 2013 г.) автор удостоен Грамотой за лучшую научную работу в области демиелинизирующих заболеваний.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 2 – в рецензируемых зарубежных изданиях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста, состоит из введения, литературного обзора, описания материала и методов исследования, 3 глав с результатами собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 260 источников (67 отечественных и 193 зарубежных).

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые в ходе клинико-генетического исследования 326 пациентов с рассеянным склерозом проанализирован вклад генов *TNF- α* , *TNFRSF1A*, *CD40*, *KIF1B* в развитие данного заболевания в популяции Новосибирской области.
2. Установлены клинико-генетические особенности фенотипа семейного рассеянного склероза в Новосибирской области: более доброкачественное течение с медленной скоростью прогрессирования, отсутствие первично-

прогредиентных форм, наибольшая конкордантность по клиническому течению в парах сиблингов; более высокая частота аллеля *T* полиморфизма rs3135388.

3. В популяции Новосибирской области шанс развития рассеянного склероза увеличивает носительство определенных риск-аллелей полиморфизмов генов иммунного ответа.
4. Выявлено достоверное влияние генетических факторов на фенотипическую экспрессию рассеянного склероза. Благоприятные формы рассеянного склероза с медленной скоростью прогрессирования, длительной первой ремиссией ассоциированы с определенными аллельными полиморфизмами генов *CD40*, *TNF-α*. Риск ремитирующего типа течения с высокой клинической активностью рассеянного склероза возрастает у носителей аллеля *T* полиморфизма rs3135388.
5. Отдельные полиморфные варианты гена *CD40* ассоциированы с эффективностью специфической иммуномодулирующей терапии препаратами, изменяющими течение рассеянного склероза (глацирамера ацетата и ИФН-бета1a в/м).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал исследования

В настоящей работе представлены результаты обследования и наблюдения больных РС, состоящих на учете в Новосибирском областном центре рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний нервной системы на базе ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница». Все больные хотя бы однократно осматривались лично автором в период с сентября 2009 г. по декабрь 2012 г.

Для описания и анализа клинических характеристик заболевания в исследование были включены 326 больных с РС в соответствии с критериями Макдональда [Polman С.Н. et al., 2005, 2011], русских по национальности, проживающих в г. Новосибирске и Новосибирской области.

В качестве контрольной группы, которая была введена для выявления влияния генетических факторов на риск РС, выступали лица (n=575) без воспалительных заболеваний центральной нервной системы, проживающие в г. Новосибирске (203 мужчины и 372 женщины, средний возраст \pm SD: 33,6 \pm 10,9). Группа контроля соответствовала по половому и национальному составу группе больных РС.

Исследование было одобрено Этическими комитетами ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница» (протокол №6 от 18.10.2010) и ГБОУ ВПО «Новосибирский Государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России (протокол №39 от 29.12.2011). Для участия в исследовании у всех пациентов было получено письменное информированное согласие.

В основной группе больных РС отмечается преобладание женщин в соотношении 1:1,9 (112 мужчин и 214 женщин). Медиана возраста составила 35 лет. Средний возраст $36,3 \pm 10,4$ лет. Начало заболевания определялось по времени появления первых симптомов, уточнялось по данным локального регистра. Средняя длительность заболевания составила $8,98 \pm 8,70$ лет. Медиана возраста дебюта РС составила 26 лет (min – 9, max – 51). Длительность первой ремиссии в среднем – 16 мес. (min – 1, max – 300).

Тип течения РС определялся в соответствии с международной классификацией, предложенной F.D. Lublin и S.C. Reingold [Lublin F.D., Reingold S.C., 1996]. У большинства больных (72%) этой группы был диагностирован ремитирующий характер течения РС. Вторично-прогрессирующее течение наблюдалось у 22% пациентов, ремитирующе-прогредиентное и первично-прогредиентное – по 3%.

В отношении основных стадий РС мы пользовались определениями, данными комиссией Макдональда [Mc Donald W. et al, 2001; Макдональд В. с соавт., 2003; Polman С.Н. et al., 2005].

За последний год до включения в программу наблюдения каждый больной перенес в среднем 1 обострение (среднее значение $1,01 \pm 0,73$). Среднегодовое количество обострений было рассчитано ретроспективно на основании медицинских документов, данных локального регистра и со слов пациента в подгруппе с ремитирующим течением РС. За временной интервал для анализа выбраны первые 10 лет заболевания. Среднегодовая частота обострений в указанной подгруппе составила $0,82 \pm 0,62$.

271 пациент (87% от общего числа больных) когда-либо получал иммуномодулирующую терапию препаратами, изменяющими течение РС (ПИТРС): 23% пациентов принимали глатирамера ацетат, 20% – интерферон бета-1а в/м 1 р/нед, 15% – интерферон бета-1б, 13% – интерферон бета-1а п/к 3 р/нед, 5% – митоксантрон, 3% – циклофосфан. 21% больных получали лечение в рамках рандомизированных клинических исследований.

Методы исследования

Все пациенты прошли стандартное клиническое обследование (тщательный сбор анамнеза, включая семейный, физикальный и неврологический осмотр), МРТ-исследование на высокопольном томографе, молекулярно-генетическое исследование. На каждого участника заполнялась специально разработанная формализованная анкета, включающая демографические данные (возраст, пол, национальность), медицинскую информацию (возраст дебюта, длительность заболевания, скорость прогрессирования, тип течения, сопутствующие аутоиммунные заболевания) и генетический статус (относительно наличия родственников с РС или другими аутоиммунными заболеваниями). Информацию заносили в созданную в программе Microsoft Office Excel базу данных.

Клинические методы исследования

Достоверность РС оценивали по критериям McDonald [Polman С.Н. et al., 2005, 2011]. Оценка неврологического статуса проводилась по

стандартной методике и включала исследование функции черепно-мозговых нервов, двигательного-рефлекторной сферы, координаторной системы, чувствительной сферы, функций тазовых органов и когнитивных функций.

Для объективизации клинической картины заболевания использовалась оценка функциональных систем (FS) по Куртцке и расширенная шкала инвалидизации по Куртцке EDSS (Expanded Disability Status Scale) [Kurtzke J.F., 1983]. На основе шкалы FS дополнительно введены такие показатели как «сумма неврологического дефицита» (СНД), представляющая собой сумму баллов 8 функциональных систем, и количество пораженных функциональных систем, отражающие степень поражения нервной системы [Малкова Н.А., Иерусалимский А.П., 2006]. Балл EDSS оценивался не ранее чем через 3 месяца после последнего обострения, до назначения ПИТРС. Оценка EDSS пациентов, которые уже получали иммуномодулирующую терапию на момент включения в исследование, была получена из локального регистра центра рассеянного склероза и других аутоиммунных заболеваний нервной системы.

Для оценки быстроты нарастания неврологического дефицита (т.е. прогрессирования РС) использовались 2 параметра: балл по шкале тяжести РС (MSSS, Multiple Sclerosis Severity Score) [Roxburgh R.H.S.R. et al., 2005] и скорость прогрессирования, определяемая путем соотношения степени тяжести в баллах шкалы EDSS к длительности заболевания в годах [Verians E. et al, 1983, Малкова Н.А., 1988, 2006]. Для расчета баллов MSSS нами использовалась специально разработанная программа MSSStest (версия 3.0, 2007), реализующая основные принципы метода, описанного Roxburgh R.H.S.R. с соавт (2005). Данные параметры оценивались на основании исходных баллов EDSS до назначения ПИТРС.

В таблице 1 приведена обобщенная характеристика больных РС и группы контроля.

Таблица 1. Характеристики больных РС и группы контроля

	Группа РС	Контрольная группа	P-value
Общее количество пациентов	326	575	
Возраст (лет)	36,3±10,4	33,6±10,9	>0.05
Пол мужчины:женщины	1:1,90	1:1,83	>0.05
Возраст дебюта (лет)*	26 (21; 33)		
EDSS	3,01±1,76		
Длительность заболевания (лет)	8,98±8,7		
Длительность первой ремиссии (мес)*	16 (9; 48)		
РПРС/ ППРС/ВПРС/РРС	9/11/73/233		
Скорость прогрессирования (балл/год)*	0,35 (0,2; 0,61)		
MSSS *	3,90 (2,1; 6,1)		
Среднегодовая частота обострений	0,82±0,62		
Наличие родственников с РС (%)	25 (7,7 %)		

Сравнение больных РС и группы контроля по возрасту выполняли методом Манна-Уитни.

* Данные приведены в формате: Медиана (нижняя квартиль; верхняя квартиль).

Для описания частоты семенных случаев РС рассчитывались показатели, выраженные в процентах: общий риск повторяемости (доля родственников с РС внутри исследуемой группы) и семейный риск повторяемости (доля семей пробандов, в которых имеется второй случай РС).

Молекулярно-генетические методы исследования

Исследование ассоциаций генетических факторов, полиморфных локусов нескольких генов с РС, проводили согласно дизайну «случай-контроль».

Молекулярно-генетическое исследование выполнено на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН в г. Новосибирске (директор – академик РАН Власов В.В.). На основании данных литературы для изучения были выбраны 8 полиморфизмов: rs1800629 (*TNF α*), rs4149584 (*TNFRSF1A*), rs6074022, rs1883832, rs1535045 и rs11086998 (*CD40*) и rs10492972 (*KIF1B*) и rs3135388. Все изученные варианты являются однонуклеотидными заменами (SNP, от [англ. Single nucleotide polymorphism](#)). Поскольку на развитие воспалительных процессов оказывает влияние взаимодействие между рецепторами суперсемейства *TNF*, экспрессированными на Т-клетках и *TNF*-лигандами, для изучения были выбраны гены 3 представителей семейства рецепторов *TNF*: *TNF- α* , который считается классическим провоспалительным цитокином, и поверхностных рецепторов *TNFRSF1A* и *CD40* (ко-стимулирующий фактор). Ген *KIF1B*, кодирующий белок кинезин, напрямую не относится к генам иммунной системы. Однако, исходя из данных полученных на животных моделях, предполагается, что полиморфизм этого гена (rs10492972), может быть ассоциирован с темпами нарастания инвалидизации, которые отражают скорость аксональной потери [Su K.G. et al., 2009]. Поскольку одной из задач исследования явилось изучение ассоциации отдельных аллелей и генотипов с клиническими характеристиками заболевания (включая скорость прогрессирования) нами было решено включить в протокол генотипирование по данному SNP. Полиморфизм rs3135388 включен в молекулярно-генетическое исследование как генетический маркер носительства аллеля *HLA-DRB1*15* (уже доказанного генетического фактора риска РС, в т.ч. в популяции Новосибирской области) с целью верификации возможного влияния системы *HLA* на выявленные ассоциации по другим генам.

ДНК выделяли из 3-5мл венозной крови с использованием стандартной процедуры, включающей выделение и лизис клеток крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией примесей фенол-хлороформом и осаждение ДНК этанолом [Johns M.V. et al., 1989].

Генотипирование проводилось методом ПЦР в режиме реального времени (Real-time ПЦР) с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфной нуклеотидной последовательности.

В нашем исследовании сотрудники ИХБФМ СО РАН проводили ПЦР в конечном объеме 25 мкл (65 mM Трис-HCl, pH 8.9, 16 mM сульфат аммония, 3.5 mM MgCl₂, 0.01%-ный Tween20, 0.2 mM dNTP, 0.3 мкМ растворы

олигонуклеотидных праймеров, 0.1 мкМ растворы TaqMan-зондов, 20–100 нг ДНК и 1 ед. акт. TaqДНК-полимеразы). Амплификация проводилась с помощью амплификатора iCycler iQ5 (Bio-Rad, США).

Методы статистического анализа

Статистический анализ полученных результатов проводился на Intel-совместимом персональном компьютере с использованием статистических программ Statistica for Windows, v.8.0 (StatSoft, Inc.) и языка программирования R (version 2.11.0, www.r-project.org). Различия в возрасте пациентов анализировали с помощью U-критерия Мана-Уитни. В качестве нулевой гипотезы принималась гипотеза об отсутствии различий в группах.

Корреляционный анализ данных проведен с помощью определения коэффициента корреляции Пирсона.

Для выявления ассоциации возраста начала, длительности заболевания, EDSS и средней скорости прогрессирования с генотипом использовали линейный регрессионный анализ (функция «glm» языка программирования R).

Соблюдение равновесия Харди-Вайнберга оценивали точным тестом Фишера, с помощью on-line программы DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия): <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> (при $p > 0,05$ равновесие выполняется). Статистическую оценку достоверности различий в распределении частот полиморфных аллелей и генотипов между исследованными выборками выявление ассоциаций генотипа с развитием заболевания проводили стандартным методом χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность (при $p < 0,05$ результаты считались статистически значимыми). Рассчитывали отношения шансов (OR, odds ratio) с указанием 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ). Нулевыми гипотезами являлись соответствие распределению Харди-Вайнберга и отсутствие ассоциаций (OR=1).

Для выявления ассоциаций темпов прогрессирования по баллу MSSS с генотипом и определения достоверности различий медиан нескольких подгрупп рассчитывался H-критерий Краскела-Уоллиса (*Kruskal-Wallis test*) с помощью программы MSSStest. Для сравнений 2 групп генотипов, применялся идентичный тесту Краскела-Уоллиса U-критерий Манна-Уитни. Пациенты с длительностью менее 1 года исключены из данного анализа, т.к. на основании EDSS оценки в первый год болезни нельзя адекватно спрогнозировать дальнейшую скорость прогрессирования заболевания.

Для всех видов статистического анализа различия считались статистически достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние полиморфизмов генов цитокинов на риск рассеянного склероза в популяции новосибирской области

CD40, *TNF α* и *TNFRSF1A* относятся к семейству рецепторов TNF и играют важную роль в развитии аутоиммунных процессов.

Распределение генотипов всех изученных полиморфных локусов гена *CD40* соответствовало закону Харди-Вайнберга как в группе больных РС, так и в группе контроля (HWE $p > 0.05$).

Распределение частот аллелей полиморфизмов rs6074022, rs1535045, rs11086996 гена *CD40* в группе больных РС и контрольной группе не различалось ($p = 0,58$, $p = 0,89$ и $p = 0,26$ соответственно) (см. Табл. 1).

Таблица 1

Частотный ассоциативный анализ полиморфных локусов гена *CD40*

Ген	SNP	Аллель	Частота		Отношение шансов (OR)	95% ДИ	p
			РС	Контроль			
CD40	rs6074022	C	0,23	0,24	0.93	0.75-1.18	0,58
	rs1883832	T	0,34*	0,23	1.74	1.41-2.16	$2.96 \cdot 10^{-7}$
	rs1535045	T	0,26	0,26	0.98	0.79-1.28	0,89
	rs11086996	G	0,01	0,02	0,61	0.26-1.46	0,26

Не обнаружено значимой ассоциации аллелей и генотипов вышеуказанных трех полиморфных локусов гена *CD40* с предрасположенностью к РС в популяции Новосибирской области, в том числе после дополнительного анализа с учетом типов течения РС и половой принадлежности.

Частота аллеля T полиморфного варианта rs1883832 *CD40* оказалась статистически значимо выше в группе больных РС (34%) по сравнению с контрольной группой (23%).

Выявлена ассоциация аллеля T полиморфизма rs1883832 гена *CD40* с РС (OR=1,74, 95%ДИ 1.34-2.32, $p = 2.96 \cdot 10^{-7}$). Также прослеживается значимая ассоциация генотипов TT и TC rs1883832 *CD40* с предрасположенностью к РС. Гомозиготы, имеющие генотип TT по полиморфизму rs1883832 *CD40*, имеют наиболее высокий риск развития РС в представленной когорте (OR=3,31, 95%ДИ 2.012-5.452, $p = 1.02 \cdot 10^{-6}$).

Обнаружено, что частота аллеля T полиморфизма rs1883832 гена *CD40* с РС статистически значимо выше у больных РС вне зависимости от типа течения. Однако уровень значимости p оказался выше в подгруппе рецидивирующих форм РС, возможно, в связи с большей выборкой (см. Табл. 2)

Таблица 2

Частоты встречаемости генотипов и риск-аллелей полиморфных локусов гена *CD40* и расчет отношений шансов с учетом типов течения РС

SNP	Подгруппа	Количество пациентов (частота, %)			Риск-аллель: F _a , %	OR _a [95% CI]	p-value
		T/T	T/C	C/C	C		
rs6074022							
	P-PC	171 (59,8)	96 (33,6)	19 (6,6)	23%	1,02 [0,80-1,29]	0,89
	П-PC	11 (55,0)	6 (30)	3 (15)	30%	1,45 [0,73-2,89]	0,29
	Контроль	335 (58,3)	208 (36,1)	32 (5,6)	23%		
rs1883832		C/C	C/T	T/T	T		
	P-PC	129 (45,7)	118 (41,8)	35 (13,5)	33%	1,69 [1,34-2,11]	3,42*10⁻⁶
	П-PC	8 (40)	9 (45)	3 (15)	38%	2,03 [1,05-3,91]	0,03
	Контроль	343 (59,8)	200 (34,8)	31 (5,4)	23%		
rs1535045		C/C	C/T	T/T	T		
	P-PC	150 (54)	105 (37,8)	23 (8,2)	27%	1,07 [0,85-1,35]	0,54
	П-PC	13 (68,4)	5 (26,3)	1 (5,3)	18%	0,65 [0,28-1,49]	0,31
	Контроль	315 (55,1)	219 (38,3)	38 (6,6)	26%		
rs11086998		C/C	C/G	G/G	G		
	P-PC	271 (97,8)	6 (2,2)	0 (0)	1%	0,61 [0,24-1,53]	0,29
	П-PC	19 (95)	1 (5)	0 (0)	3%	1,43 [0,19-10,93]	1,46
	Контроль	548 (96,5)	20 (3,5)	0 (0)	2%		1,00

Примечание: P-PC – подгруппа 1 (больные с рецидивирующими формами РС: PPC, ВПРС); П-PC – подгруппа 2 (прогрессирующее течение: ППРС, РПРС); p-value – уровень статистической значимости, F_a – частота аллеля, OR_a [95% CI] – отношение шансов [95%-ный доверительный интервал].

Распределение генотипов полиморфных локусов rs1800629 и rs4149584 соответствовало ожидаемому по закону Харди-Вайнберга в группе больных РС и в группе контроля (HWE p>0.05). В исследованной выборке не найдено увеличения риска развития РС в зависимости от носительства тех или иных

аллелей и генотипов изученных полиморфизмов гена *TNF-α* (rs1800629) и *TNFRSF1A* (rs4149584) (см. таблицу 3). Однако после статистического анализа с поправкой на пол и возраст выявлено снижение риска развития РС в популяции Новосибирской области при носительстве аллеля А полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* (см. Табл. 5).

Таблица 3

Частотный ассоциативный анализ полиморфных локусов генов *TNF-α* (rs1800629) и *TNFRSF1A* (rs4149584)

Ген	SNP	Аллель	Частота		Отношение шансов (OR)	95% ДИ	p
			РС	Контроль			
<i>TNF-α</i>	rs1800629	А	0,13	0,13	0,96	0,63-1,45	0,84
<i>TNFRSF1A</i>	rs4149584	А	0,02	0,02	0,95	0,32-2,81	1,00

Распределение генотипов 2 остальных изученных полиморфных локусов также соответствовало распределению Харди-Вайнберга как в группе больных РС, так и в группе контроля (HWE $p > 0.05$).

По частоте аллелей полиморфизма rs10492972 (*KIF1B*) группа больных РС и здоровых лиц значимо не различалась (по аллелю С: 30% против 32%, $p = 0,60$). Не обнаружено влияния этого полиморфного локуса гена *KIF1B* на риск развития РС в исследованной группе (см. Табл. 4). После дополнительного анализа с учетом типов течения РС и половой принадлежности статистически значимых различий не выявлено.

Таблица 4

Частотный ассоциативный анализ полиморфных локусов генов, не относящихся к генам цитокинов

Ген	SNP	Аллель /генотип	Частота		Отношение шансов (OR)	95% ДИ	p
			РС	Контроль			
<i>KIF1B</i>	rs10492972	С	0,30	0,32	0.94	0.73-1.20	0.60
	rs3135388	Т	0,25*	0,09	3.23	2.44-4.29	$3.8 * 10^{-17}$

Таблица 5

Частотный ассоциативный анализ полиморфных локусов с учетом пола и возраста

Ген	SNP	Аллель	Частота		Отношение шансов (OR _{adjusted sex and age})	95% ДИ	p
			РС	Контроль			
<i>TNF-α</i>	rs1800629	А	0,13	0,13	0,62	0,43-0,89	0,009

Ген	SNP	Аллель	Частота		Отношение шансов	95% ДИ	p
			0,23	0,24			
CD40	rs6074022	C	0,23	0,24	0,92	0,73-1,16	0,49
CD40	rs1883832	T	0,34	0,23	1,65	1,33-2,05	5,37* 10 ⁻⁶
	rs3135388	T	0,25	0,09	3,06	2,28-4,11	8,3* 10 ⁻¹⁴

Частота аллеля Т полиморфного локуса rs3135388 в группе больных РС (25%) по сравнению с контролем (9%) была значимо выше ($p < 0,001$). Выявлена статистически значимая ассоциация аллеля Т полиморфизма rs3135388 с предрасположенностью к РС ($OR=3,23$, 95%ДИ 2.43-4.29, $p=3.8 \cdot 10^{-17}$) (табл. 4, 5). Индивиды, несущие генотип ТТ по полиморфизму rs3135388 имеют наиболее высокий риск развития РС в представленной когорте ($OR=7,84$, 95%ДИ 3.19-19.27, $p=1.9 \cdot 10^{-7}$).

Однако после анализа с учетом типа течения обнаружено, что только группа больных с изначально рецидивирующим течением РС достоверно отличалась от контрольной группы по распределению частот аллелей и генотипов. В этой подгруппе риск-аллель Т встречался чаще по сравнению со здоровыми лицами (26 % против 9 % в контроле). То есть маркерами повышенного риска рецидивирующих форм РС оказались аллель Т ($OR=3,23$, 95%ДИ 2.50-4.47, $p=2,44 \cdot 10^{-17}$) и генотип ТТ rs3135388 ($OR=8,88$, 95%ДИ 3.60-21,88, $p=2,14 \cdot 10^{-8}$) (табл. 6). А генотип СС rs3135388 является маркером пониженного риска РС ($OR=0,11$, 95%ДИ 0,05-0,28, $p=2,14 \cdot 10^{-8}$). В подгруппе же прогрессирующего РС значимых различий по распределению генотипов не обнаружено. Таким образом, аллель Т полиморфного варианта rs3135388 ассоциирован с рецидивирующими формами течения РС в исследованной популяции русских, проживающих в Новосибирской области.

Таблица 6

Частоты встречаемости генотипов и риск-аллеля полиморфного локуса rs3135388 и расчет отношений шансов с учетом типов течения РС

SNP	Подгруппа	Количество пациентов (частота, %)			Риск-аллель: F _a , %	OR _a [95% CI]	p-value
		C/C	C/T	T/T			
rs3135388	Р-РС	128 (56,1)	83 (36,4)	17 (7,5)	26%	3,23 [2,50-4,47]	2,44*10⁻¹⁷
	П-РС	13 (81,3)	3 (18,7)	0 (0)	9%	1,00 [0,30-3,35]	1,02
	Контроль	468 (82,5)	92 (16,2)	7 (1,3)	9%		

Полиморфный локус -308G->A TNF α находится в сцеплении с функциональным полиморфизмом, предрасполагающим в высокой степени к развитию РС. Таким функциональным полиморфизмом может являться *HLA-DRB1*15*. В нашем исследовании мы не проводили генотипирование по

HLA-DRB1, однако у нас есть данные по полиморфизму rs3135388, сцепленному с *HLA-DRB1*15*.

Действительно, аллель Т полиморфизма rs3135388 достоверно увеличивает риск развития РС, в т.ч. и в группе с благоприятным дебютом (OR=3.93 [2.41-4.79], $p=3*10^{-12}$), так же как и аллель G полиморфизма rs1800629 гена *TNF- α* , хотя значение относительного риска по полиморфизму 308G->A *TNF- α* значимо меньше и с более низким уровнем p-value.

По нашим данным можно с высокой долей вероятности предполагать, что полиморфизмы 308G->A *TNF α* и rs3135388 находятся в сцеплении ($D'=0.53$, $r^2=0.006$, $\chi^2=5.01$).

С помощью теста максимального правдоподобия (LRT) показано, что аллель Т полиморфизма rs3135388 является ключевым генетическим фактором риска между 308G->A *TNF α* и rs3135388. Учитывая данные литературы о неравновесном сцеплении полиморфизма rs3135388 с *HLA-DRB1*15*, можно предполагать, что ассоциация полиморфизма 308G->A *TNF α* с РС индуцирована *HLA-DRB1*15*.

И действительно, согласно опубликованным данным исследования, проведенного коллективом авторов и объединившего результаты генотипирования большой когорты больных РС и здоровых, подтверждено наличие сцепления между 308G->A *TNF α* и *HLA-DRB1*15* ($D'=0.78$, $r^2=0.02$, $\chi^2=5.53$).

Таким образом, на основании результатов генотипирования подтверждено влияние полиморфизмов генов цитокинов (а именно rs1883832 CD40) на риск развития РС в исследованной когорте. При наличии аллеля Т этого полиморфизма риск РС умеренно, однако достоверно увеличивается в 1,65 раз, у гомозигот TT относительный риск составляет 3,31.

*Полученные данные позволяют рассматривать в качестве генетических факторов риска РС в популяции Новосибирской области носительство аллеля Т полиморфного локуса rs3135388, аллеля Т полиморфного варианта rs1883832 гена CD40 и аллеля G полиморфизма rs1800629 гена *TNF α* вне зависимости от пола, возраста.*

*Не выявлено ассоциаций изученных полиморфных локусов генов *TNFRSF1A* (rs4149584) и *KIF1B* (rs10492972) с рассеянным склерозом у русских, проживающих в Новосибирской области.*

Влияние генетических факторов на фенотипическую экспрессию рассеянного склероза

В группе включенных в исследование больных РС преобладали пациенты с легкой и умеренной степенью инвалидизации, на что указывает средний показатель EDSS $3,01\pm 1,76$ балла (min 1, max 8,5). Количество вовлеченных в процесс (клинически) функциональных систем (FS Kurtzke) колебалось от 1 до 7 и в среднем составило $4,61\pm 0,08$. Сумма неврологического дефицита (СНД), как показатель глубины поражения структур нервной системы, была $9,56\pm 0,28$ (минимальная - 1, максимальная -

26). Другие рассчитанные параметры, описывающие темпы нарастания инвалидизации, также указывают на среднюю скорость прогрессирования у большинства больных. Медиана балла MSSS составила 3,90 (2,1; 6,1), скорости прогрессирования 0,55 баллов в год ($0,2 \div 0,6$), при этом у 30% пациентов скорость прогрессирования составила менее 0,25 баллов в год, у 46% больных – от 0,25 до 0,75, и у 24% – выше 0,75 баллов в год.

Что касается неврологической симптоматики в дебюте РС, то на первом месте по частоте в исследованной выборке стоят двигательные нарушения в виде пирамидных парезов той или иной выраженности (у 25,5% больных, $n=84$). Вторыми по частоте симптомами дебюта (23,2%, $n=76$) были зрительные расстройства, которые проявлялись клиникой оптического неврита с выраженным снижением остроты зрения (обычно односторонним) и, как правило, значительным последующим восстановлением. Нарушения чувствительности как первые проявления РС отмечены у 67 пациентов (20,1%) и включали себя: онемение различной локализации, парестезии, чувством, ощущение прохождения электрического разряда по позвоночнику (симптом Лермитта), иногда – корешковые боли. У 16,4% больных ($n=53$) заболевание началось со стволовых симптомов: диплопия, эпизод вестибулярных нарушений (вертиго, неустойчивость, тошнота, рвота), реже – с вовлечением других черепно-мозговых нервов (лицевого, тройничного). У 8,7% больных ($n=28$) дебют был определен как «полисимптомный», свидетельствующий о вовлечении в патологический процесс нескольких функциональных структур. Симптомы поражения мозжечка (шаткость, неустойчивость, дискоординация конечностей) выявлены у 4,4% больных ($n=13$). Самыми редкими симптомами (1,3%, $n=4$) дебюта РС было нарушение функции тазовых органов по центральному типу, обычно в виде задержки или императивных позывов на мочеиспускание. У 1 пациента (0,3%) в дебюте РС отмечен эпи-синдром.

Поскольку одним из прогностических критериев течения РС является пол пациента [Малкова Н.А., 2006; Шмидт Т.Е., Яхно Н.Н., 2010; Какуля А.В., 2012] проведен сравнительный анализ клинической картины у мужчин и женщин. Обобщенная характеристика приведена в *Таблице 7*.

Из *таблицы 7* видно, что основные клинические характеристики не различались в зависимости от пола. Однако пирамидные симптомы как первое проявление РС у мужчин наблюдалось более, чем в 2 раза чаще (39,6 % против 18%, $p<0,01$). У женщин преобладающими в структуре симптомов дебюта оказались зрительные и чувствительные нарушения, наиболее благоприятные в прогностическом плане. Скорость прогрессирования у мужчин в исследованной группе больных РС немного выше, чем у женщин (однако статистически не значимо). При этом выявлена положительная корреляционная связь скорости прогрессирования с возрастом дебюта (у женщин $r=0,35$, у мужчин $r=0,32$, $p<0,01$) и отрицательная корреляция с длительностью первой ремиссии (у женщин $r=-0,31$, у мужчин $r=-0,40$,

$p < 0.01$), т.е. прогрессирование РС замедлено у пациентов с более ранним дебютом и длительной первой ремиссией вне зависимости от пола.

Таблица 7

Сравнение клинических характеристик РС у мужчин и женщин

Характеристики	Женщины n = 214 чел	Мужчины n = 112 чел.	p
Возраст дебюта*	27,5±8,6 года [21;33]	26,6±8,5года [20;33]	p > 0,05
Симптомы дебюта:			
зрительные	27%	14,8%	p < 0,05
чувствительные	24%	12,8%	p < 0,05
пирамидные	18%	39,6% **	**p < 0,01
стволовые	15%	18,8%	p > 0,05
полисимптомный	10%	8%	p > 0,05
мозжечковые	4,5%	4%	p > 0,05
тазовые нарушения	1,5%	1%	p > 0,05
эпиприступ	0	1%	p > 0,05
Длительность первой ремиссии, месяцы	15 [10;48]	17 [6;53]	p > 0,05
Длительность болезни, годы	7 [3,5; 14]	6 [2,5; 11]	p > 0,05
Количество FS	4 [3;5]	4 [3;5]	p > 0,05
СНД	5 [3;9]	6 [3;10]	p > 0,05
EDSS, баллы	2,5 [1,5;4]	2,5 [1,5;4,5]	p > 0,05
FS-3 («пирамидная система»)	2 [1;3]	2 [1;2]	p > 0,05
FS-4 («мозжечок»)	1 [1;2]	2 [1;3]	p > 0,05
FS-5 («чувствительность»)	1 [0;2]	1 [0;2]	p > 0,05
Скорость прогрессирования	0,51±0,06 б/г	0,64±0,02 б/г	p > 0,05
РРС+ВПРС/ППРС+РПРС	95,5/4,5%	91%/9%	p > 0,05
Среднегодовая частота обострений	0,67 [0,4; 1]	0,53 [0,39; 1]	p > 0,05

*Данные приведены в формате: Среднее значение ± SD, в скобках - [25% квартиль; 75% квартиль]), по другим параметрам – в формате: Медиана [25% квартиль; 75% квартиль]

Таким образом, на стадии начала РС у мужчин отмечается более частое вовлечение пирамидных путей. В период развернутой картины заболевания на момент обследования отмечается тенденция к большей скорости прогрессирования процесса у мужчин. Показатели прогрессирования РС коррелируют с возрастом дебюта и длительностью первой ремиссией.

Изучение влияния генотипа на такие характеристики течения РС, как возраст дебюта, длительность первой ремиссии, частота обострений, EDSS и средняя скорость прогрессирования проводили с помощью линейного регрессионного анализа. Дополнительно уточнены значения относительных рисков развития РС с учетом фенотипических характеристик заболевания.

Возраст и симптомы дебюта РС

После анализа с учетом первых симптомов РС обнаружено несколько ассоциаций. В подгруппе с «благоприятными» симптомами дебюта (чувствительные, зрительные и стволовые расстройства) распределение частот аллелей и генотипов достоверно отличалось от контрольной группы: аллель А встречается реже по сравнению со здоровыми лицами (9 % против 13 % в контроле), OR=0.61, 95%ДИ 0.39-0.95, p=0.03; с поправкой на пол и возраст OR=0.63 [0.40-0.99], p=0.04. Таким образом, можно говорить о протективном эффекте аллеля А полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α*.

Подтверждена ассоциация аллеля Т полиморфизма rs1883832 гена *CD40* с риском РС с благоприятным началом (OR=1.55 [1.19-2.02], p=0.001; с поправкой на пол и возраст OR=1.52 [1.17-1.99], p=0.002).

Первая ремиссия

С помощью линейного регрессионного анализа не обнаружено значимых различий в длительности первой ремиссии у носителей различных аллелей и генотипов.

В то же время интересным представляется, что показаны ассоциации с предрасположенностью к РС в группе с длительной первой ремиссией по нескольким полиморфным локусам, в частности rs1800629 (*TNF-α*) и rs1883832 гена *CD40*. Т.е. аллель G полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* и редкий аллель Т rs1883832 гена *CD40* умеренно, но достоверно увеличивают риск РС с первой ремиссией более 12 месяцев. А редкий аллель А полиморфизма rs1800629 гена *TNF-α* можно считать протективным.

По другим исследованным полиморфизмам не выявлено различий в рисках РС в зависимости от продолжительности первой ремиссии.

Тип течения РС

Значимых различий в частотах аллелей и генотипов изученных полиморфных локусов гена *CD40* в зависимости от типа течения РС не выявлено. Это согласуется с полученными результатами, что полиморфизм rs1883832 гена *CD40* ассоциирован с РС, а остальные полиморфные варианты не ассоциированы с риском РС вне зависимости от типа течения.

Выявлено статистически значимое отличие по распределению частот аллелей полиморфизма rs3135388 между подгруппами с различными формами течения РС. У больных с рецидивирующим РС по сравнению с пациентами с прогрессирующими формами (ПРСО, ППРС) обнаружено достоверное повышение частоты аллеля Т (26% против 9%, $\chi^2=4,28$, p=0,038).

Влияния полиморфных вариантов rs1800629 *TNF-α*, rs4149584 *TNFRSF1A* и rs10492972 (*KIF1B*) на формирование типа течения РС не выявлено.

Балл EDSS Согласно результатам линейного регрессионного анализа не подтверждена ассоциация исследуемых полиморфизмов с уровнем инвалидизации по шкале EDSS.

Среднегодовая частота обострений Значимого различия в среднегодовой частоте обострений в зависимости от того или иного генотипа

не выявлено.

Относительный риск развития РС с различной клинической активностью (т.е. с высоким или наоборот низким среднегодовым количеством обострений) по полиморфизмам rs1800629 (*TNF α*), rs4149584 (*TNFRSF1A*), rs6074022, rs1883832, rs1535045 и rs11086998 (*CD40*) и rs10492972 (*KIF1B*) существенно не отличается.

Однако выявлено статистически значимое отличие по распределению частот аллелей полиморфизма rs3135388 по сравнению с контролем в группе с высокой среднегодовой частотой обострений (2 и более в год): 21% против 9% в контроле по аллелю Т (OR=2.51 [1.07-5.91], $p=0.04$). Наибольший риск развития РС с высокой клинической активностью выявлено у гомозигот ТТ по полиморфизму rs3135388 (OR=11.14 [2.09-59.35], $p=0.0004$).

Таким образом, достоверно показано влияние полиморфизма rs3135388 на среднегодовое количество обострений РС.

Скорость прогрессирования РС

В группе с медленной скоростью прогрессирования РС (<0,25 баллов/год), так же как и при анализе с учетом длительности первой ремиссии и характера дебюта, показаны различия в распределении частот аллелей по тем же полиморфным локусам: rs1800629 *TNF- α* и rs1883832 *CD40*. Это также подтверждает известное и подтвержденное в нашей работе положение о том, что скорость прогрессирования меньше у пациентов с более ранним дебютом и длительной первой ремиссией.

Т.е. аллель G полиморфизма rs1800629 гена *TNF- α* и редкий аллель Т rs1883832 гена *CD40* ассоциированы с увеличением риска РС с медленной скоростью прогрессирования (rs1800629, аллель G: OR=1.95 [1.08-3.51], $p=0.024$; rs1883832, аллель Т: OR=1.58 [1.15-2.17], $p=0.005$). Данные полиморфные локусы вносят вклад в формирование фенотипа благоприятного течения РС.

По другому полиморфизму гена *CD40* rs6074022 при анализе его связи со скоростью прогрессирования выявлена значимая ассоциация с помощью линейного регрессионного анализа. У носителей редкого аллеля С этого полиморфного локуса скорость прогрессирования статистически значимо выше на 0.14 ± 0.06 баллов/год ($p=0,01$). Балл по шкале MSSS также выше у носителей генотипа СС (5.45 против 4.20 и 4.24), однако различие не достигло статистически значимого уровня ($p=0.26$).

У гомозигот по редкому аллелю Т, т.е. у пациентов с генотипом ТТ полиморфизма rs1535045 гена *CD40* достоверно более низкий балл MSSS – 3,32 (против 4,16 у гетерозигот и 4,41 у носителей СС), т.е. наблюдается более медленное прогрессирование РС ($p=0.04$).

Никаких достоверных ассоциаций полиморфизма гена *TNFRSF1A* с клиническими характеристиками заболевания выявлено не было, возможно из-за малого размера выборки и отсутствия возможности применить соответствующие статистические методы.

Не выявлено также ассоциации полиморфного локуса rs10492972 гена *KIF1B* с риском РС и показателями прогрессирования, и вообще вопрос о наличии такой ассоциации является очень дискуссионным [Gourraud P.A., IMSSGC, 2011]. В проведенном нами [Kudryavtseva E.A. et al., 2011] мета-анализе, включившем результаты пяти крупных исследований [Aulchencko et al., 2008; The Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2009; Booth et al., 2010; Martinelli-Boneschi F. et al., 2010; Koutsis G. et al., 2011] из-за высокой гетерогенности больных не было выявлено ассоциации с риском РС. Однако во втором мета-анализе (В на *рис. 2*) после исключения результатов исследования Aulchencko Y. et al. (2008) показан статистически значимый ($p=0.02$) протективный эффект аллеля С полиморфизма rs10492972 в отношении риска РС (см. *Рис. 1*).

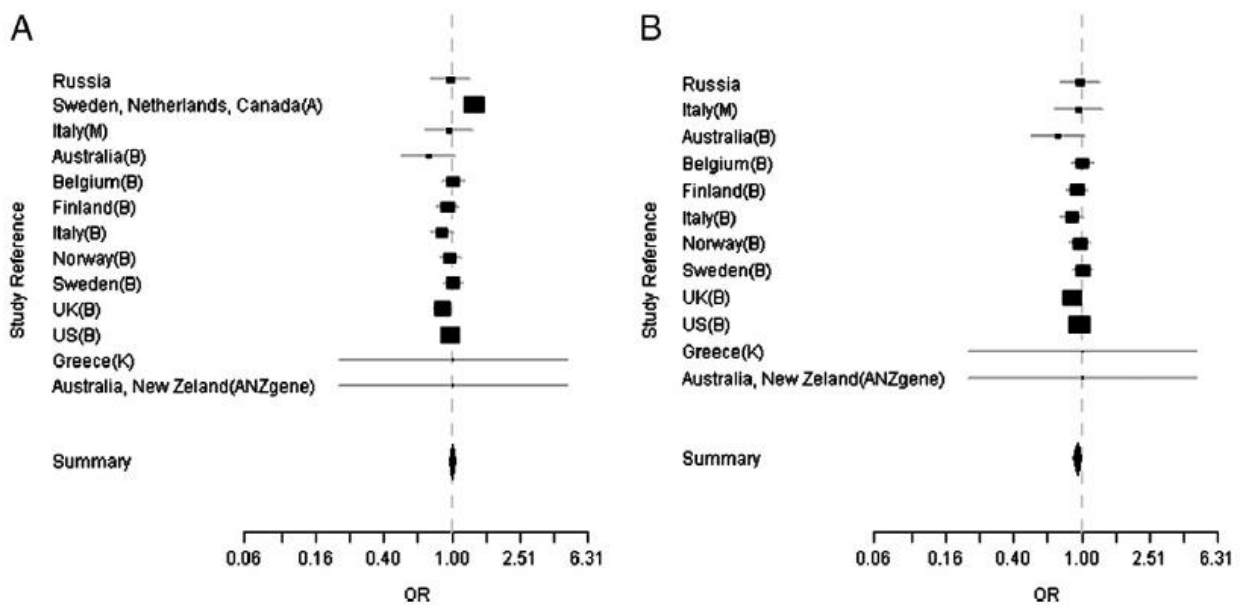


Рис. 1 Мета-анализ исследований ассоциации полиморфного локуса rs10492972 гена *KIF1B* с риском РС

Условные обозначения: А – мета-анализ, включающий все исследования;

В – мета-анализ, не включающий результаты исследования Aulchencko Y. et al., 2008.

(А)—Aulchencko et al., 2008; (В)— Booth et al., 2010; (М)— Martinelli-Boneschi et al., 2010; (К)— Koutsis et al., 2011; ANZgene— The Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2009.

Продемонстрировано достоверное влияние генетических факторов на фенотипическую экспрессию РС на примере полиморфных вариантов нескольких генов. Благоприятными прогностическими факторами в отношении характера дебюта, медленной скорости прогрессирования и длительной первой ремиссии являются аллели Т полиморфизма rs1883832, rs1535045 гена CD40 и аллель G варианта rs1800629 гена TNF-α. Риск высокой клинической активности ремитирующего рассеянного склероза возрастает у носителей аллеля Т полиморфизма rs3135388.

Влияние генетических факторов на эффективность терапии рассеянного склероза

От 30 до 50% больных не отвечают на терапию ПИТРС 1-й линии. Были проанализированы данные генотипирования 100 пациентов с ремитирующим РС: 46 из них получал глатирамера ацетат, 54 – интерферон-бета1а (ИФН-бета1а) в/м 1 р/нед. Приверженность терапии была высокой (комплаенс более 90%). Больные на каждом из препаратов были разделены на 2 подгруппы: ответившие на терапию («R+») и не ответившие на ПИТРС («NR-»). Под отсутствием эффекта («NR-») понималось сохранение прежней частоты обострений на фоне адекватного курса терапии ПИТРС (не менее 12 мес) с отрицательной динамикой на МРТ головного мозга (появление новых T2-очагов, Gd-накапливающих очагов) или прогрессирование заболевания (стойкое увеличение балла EDSS на 1,0, подтвержденное через 6 мес); переход в стадию ВПРС.

У пациентов, получавших глатирамера ацетат критерии неэффективности терапии зафиксированы в 50% случаев, на ИФН-бета1а в/м 1 р/нед – в 30%. После проведенного ретроспективного анализа (см. *Таблицу 8*) выявлено, что группы «R+» и «NR-» на каждом из препаратов статистически значимо не отличались по возрасту, продолжительности первой ремиссии, длительности заболевания к моменту назначения ПИТРС, исходному уровню инвалидизации и скорости прогрессирования, а также клинической активности болезни (СЧО и относительному количеству пациентов с Gd+очагами на МРТ). Проанализирована также частота симптомов дебюта в зависимости от ответа на ПИТРС. У пациентов с неэффективностью глатирамера ацетата достоверно чаще РС начинался с пирамидных симптомов (39% против 13% в группе «R+»), в то время как при оптимальном ответе преобладали стволовые симптомы. Больные, получавшие ИФН-бета1а в/м, не отличались по распределению симптомов дебюта в зависимости от ответа на лечение.

Таблица 8

Ретроспективное сравнение исходных клинических характеристик РС перед назначением ПИТРС

Характеристики	Глатирамера ацетат n = 46 чел		ИФН-бета1а n= 54 чел.		p
	NR-	R+	NR-	R+	
Ответ на терапию					
Количество	23	23	15	39	
Возраст	34[28,5;41,5]	33 [28,5;38]	34 [26;36]	30 [27,8;34]	p> 0,05
Пол: муж/жен, абс. (отношение)	6/17 (1:2,8)	9/14 (1:1,6)	4/12 (1:3)	10/27 (1:2,7)	p> 0,05
Возраст дебюта, лет	28[20,5;34]	25[21,5;30]	27 [23;30,5]	26[21,3;29]	p> 0,05
Длительность первой ремиссии, месяцы	12 [7;39]	17 [7;54]	12 [5;36]	12 [6;24]	p> 0,05
Длительность болезни до назначения ПИТРС, годы	3 [2;6,5]	5 [2; 7]	2 [0,6; 3,4]	1,5 [0,6;4]	p> 0,05

Симптомы дебюта:					
Зрительные	17% (n=4)	17% (n=4)	20% (n=3)	30,8% (n=15)	p> 0,05
Чувствительные	13% (n=3)	22% (n=5)	33,3% (n=5)	38,5% (n=15)	p> 0,05
Стволовые	28% (n=5)	39% (n=9)	20% (n=3)	17,9% (n=7)	p> 0,05
Пирамидные *p<0,05	39% (n=9)*	13% (n=3)*	20%(n=3)	10,2%(n=4)	
Мозжечковые	4% (n=1)	4% (n=1)	6,7% (n=1)	2,6% (n=1)	p> 0,05
Другие	4% (n=1)	4% (n=1)	0	0	
EDSS, баллы	1,5 [1,5;2,5]	1,5 [1,5;2,25]	1,5 [1,5;2,1]	1,5 [1,5;2]	p> 0,05
Среднегодовая частота обострений	1 [1;2]	1 [1;1,5]	1 [1;1]	1 [1; 1,5]	p> 0,05
Gd+ очаги на МРТ	30%	34%	33%	28%	p> 0,05

Проведен анализ частот встречаемости генотипов и риск-аллелей полиморфных локусов с учетом ответа на терапию ПИТРС (рис. 2). У больных, не ответивших на терапию глатирамера ацетатом, статистически значимо чаще регистрировался редкий риск-аллель T полиморфизма rs1883832 CD40 (F_a 36% против 17% в группе «R+», $\chi^2 = 4.65$, p=0.03), генотипы TT и TC rs1883832 CD40 увеличивают риск резистентности к глатирамера ацетату (OR 4,29, CI 1.25-14.74, $\chi^2=5.58$, p=0,018).

В группе, лечившихся ИФН-бета1а в/м, риск неэффективности терапии статистически значимо больше у больных РС, несущих аллель C (F_a 37% против 14% в «R+», p=0,009) и генотипы TC, CC в локусе rs6074022 гена CD40 (OR 5,00, CI 1,39-17,87, $\chi^2=6,65$, p=0,009). У пациентов с оптимальным ответом на ИФН-бета1а в/м статистически значимо чаще регистрировался аллель T в локусе rs6074022 CD40 (F_a 86% против 63%, $\chi^2 = 6,80$, p=0,009).

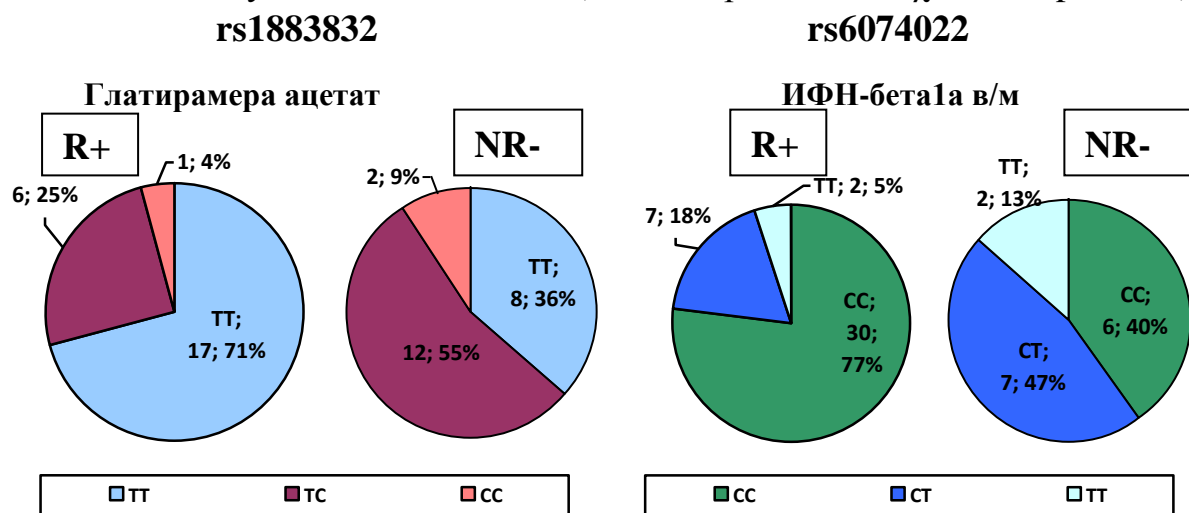


Рис. 2 Частота генотипов полиморфных локусов гена CD40 в зависимости от ответа на терапию ПИТРС

При анализе частот встречаемости аллелей других полиморфизмов достоверных различий не выявлено.

Таким образом, по результатам нашего фармакогеномного анализа выявлены ассоциации отдельных полиморфных вариантов гена CD40 с ответом на иммуномодулирующую терапию.

Риск развития резистентности к терапии глатирамера ацетатом выше у больных РС, несущих генотипы TT и TC полиморфного варианта rs1883832 CD40, к терапии ИФН-бета1а в/м – у носителей генотипов TC, CC в локусе rs6074022 гена CD40.

Выявленные данные об ассоциациях аллельных вариантов полиморфизмов с клиническими характеристиками РС и ответом на терапию ПИТРС можно рассматривать как дополнительные прогностические факторы, которые будут способствовать совершенствованию дифференцированного, индивидуального подхода к выбору медикаментозной терапии при ведении различных групп пациентов с РС. Это исследование создает основу для дальнейшего развития фармакогеномного подхода при РС с целью создания прогностического теста, позволяющего назначить наиболее эффективный для конкретного пациента иммуномодулирующий препарат.

Клинико-генетические особенности семейных случаев рассеянного склероза

Существование семейных случаев РС подтверждает наследственную природу заболевания. Риск развития РС у родственников пациентов с РС в 15-50 раз выше, чем в популяции в целом, и коррелирует со степенью родства [Ramagopalan S.V., Sadovnick A.D., 2011]. К настоящему времени существуют противоречивые данные относительно наличия клинических особенностей семейного РС, что ещё больше увеличивает актуальность такой работы. Тем более, что подобного описания в Новосибирской области не проводилось.

Случай РС определялся как *семейный* при наличии у пациента как минимум одного родственника (любой степени родства) с данным заболеванием. Из 326 больных РС, включенных в исследование, было найдено 25 больных из семейных случаев, что составило 7,7%. Семейный риск повторяемости – 6,8%. Показатели распространенности семейного РС в Новосибирской области согласуются с данными многих авторов [Карнаух В.Н., Барабаш И.А., 2009; Гончарова З. А., Фомина-Чертоусова Н. А., 2011; Бойко А.Н. и др., 2011; Compston A., 1999]. Так по результатам длительных проспективных клинико-эпидемиологического исследований в Ростовской области общий риск повторяемости составил 7,6%, семейный риск повторяемости – 7,1% [Гончарова З. А., Фомина-Чертоусова Н. А., 2011], в Амурской области – 6,4 % и 3,5% соответственно [Карнаух В.Н., Барабаш И.А., 2009]. Немного более низкая встречаемость семейных случаев РС зарегистрирована в республике Башкортостан: общий риск повторяемости – 4,1%, семейный риск повторяемости составил 2,5 % [Бахтиярова К.З., 2007].

Наибольший риск развития РС зафиксирован у родственников первой линии родства, что соответствует литературным данным.

В большинстве случаев пациент имел одного родственника с РС, в 2 семьях зафиксировано по 3 случая заболевания, однако генотипированию и обследованию были доступны только пробанды.

Средний возраст в подгруппе семейных случаев РС составил $36,0 \pm 13,9$ лет. Половой состав был классический – с преобладанием женщин в соотношении 1:1,78 (19 женщин, 6 мужчин). Средний балл EDSS (в фазу ремиссии) - $3,2 \pm 2,3$. Длительность заболевания на момент включения в исследование составила $12,6 \pm 11,2$ лет, медиана длительности первой ремиссии 16,5 мес [2,1-175,2]. После проведенного анализа выявлено, что группа семейного РС статистически значимо не отличалась от остальных включенных больных РС по возрасту, длительности заболевания и уровню инвалидизации (см. Табл. 9).

Таблица 9

Общая характеристики больных РС в зависимости от семейного анамнеза

	Спорадический	Семейный	p-value
Общее количество пациентов	301	25	
Возраст (лет)	$36,4 \pm 10,2$	$36,0 \pm 13,9$	$>0,05$
Пол мужчины:женщины	1:1,92	1:1,78	$>0,05$
Возраст дебюта (лет)	$27,5 \pm 8,5$ (26)	$23,6 \pm 8,1$ (23)	$>0,05$
EDSS	$3,0 \pm 1,7$	$3,2 \pm 2,3$	$>0,05$
Длительность заболевания (лет)	$9,0 \pm 7,8$	$12,6 \pm 11,2$	$>0,05$
Длительность первой ремиссии (мес)	17,5[3,0-144]	16,5[2,1-175,2]	$>0,05$
РПРС/ППРС/ВПРС/РРС	9/11/64/217	0/0/9/16	
Скорость прогрессирования (балл/год)	$0,60 \pm 0,61$ (0,36)	$0,30 \pm 0,25$ (0,33)	
MSSS (медиана)	4,38	3,27	0,03
Среднегодовая частота обострений	$0,80 \pm 0,62$	$0,50 \pm 0,61$	$>0,05$
Относительное количество пациентов, получающих ПИТРС	93%	88%	$>0,05$

Возраст дебюта РС в группе семейных случаев оказался немного ниже по сравнению со спорадическими, однако статистически не достоверно ($23,6 \pm 8,1$ против $27,5 \pm 8,5$, $p > 0,05$). Симптомы дебюта были различными, но при семейном РС преобладали зрительные, глазодвигательные и чувствительные нарушения (68%) и не встречались прогностически неблагоприятные тазовые расстройства, только в 1 случае (4%) первыми симптомами были мозжечковые нарушения.

Достоверных различий в длительности первой ремиссии РС не выявлено ($p > 0,05$).

В исследованной когорте из 25 семейных случаев у всех больных отмечается рецидивирующее начало заболевания, первично-прогрессирующего течения не выявлено. На момент проведения анализа 15 пациентов имели ремитирующее течение, 9 – вторично-прогрессирующее и у 1 больного заболевание находилось на стадии клинически изолированного синдрома (КИС). Показатель прогрессирования заболевания, оцененный по

шкале MSSS, в подгруппе семейного РС был достоверно ниже по сравнению со спорадическими случаями (3,27 против 4,38, $p=0,03$). Причем балл MSSS коррелировал с возрастом дебюта ($r=0.49$, $p<0.001$) и имел обратную зависимость с длительностью первой ремиссии ($r=-0.35$, $p<0.01$), т.е. прогрессирование было замедлено у пациентов с более ранним дебютом и длительной первой ремиссией.

Отмечается низкая частота повторяемости РС в исследованных нами семейных случаях (2-3 пациента в семьях), что характерно для менделевского типа наследования и свидетельствует о полигенной предрасположенности к РС, согласуется с данными других авторов [Бахтиярова К.З., 2007; Фаворова О.О. и др., 2010; Бойко А.Н. Гусев Е.И., 2012; Гончарова З.А., 2013].

В нашем исследовании выявлено небольшое (статистически не значимое) преобладание материнской передачи над отцовской (55% против 45%). С одинаковой частотой родоначальником болезни явились как женщины (бабушка, мать, тетка), так и мужчины. Эти противоречащие литературным данным [Ebers G.C., Sadovnic A.D., 1994; Eoli M. et al., 1995] результаты с одной стороны могут говорить о неполной выборке семейных наблюдений в анализируемой группе, с другой стороны, могут явиться основой для опровержения гипотезы о митохондриальном наследовании РС. Нами отмечена большая частота повторяемости РС у дочерей, братьев и сестер, что согласуется с данными В.Н. Карнаух, И.А. Барабаш (2009).

Учитывая не большое количество наблюдений пар пациентов с семейным РС, наше исследование имеет некоторые ограничения. Однако основываясь на достаточно длительном наблюдении семейных случаев РС, можно говорить том, что в родственных парах больных РС прослеживается умеренная конкордантность по клиническому течению заболевания и корреляции между возрастом дебюта РС, что соответствует данным некоторых авторов [Завалина Т.В., Трушников Т.Н. и др., 2009].

На примере сибирской когорты подтверждено наличие особенностей фенотипа семейного РС. В отличие от спорадических, семейные случаи РС характеризуются более мягким, доброкачественным течением с медленной скоростью прогрессирования, отсутствием первично-прогрессирующих форм. В парах сиблингов больных РС прослеживается наибольшая конкордантность по клиническому течению заболевания.

Молекулярно-генетическое исследования семейных случаев

Проведен анализ частот встречаемости генотипов и риск-аллелей полиморфных локусов с учетом семейного анамнеза.

У больных, имеющих родственников с РС, отмечена большая частота аллеля Т полиморфизма rs3135388 (44% против 33%, $p=0.003$).

Поскольку данный полиморфный локус является генетическим маркером носительства аллеля HLA-DRB1*15 [Hafler D.A. et al., 2007], можно предположить, что гаплотип HLA в определенной мере вносит вклад

и в формирование своеобразного течения семейных форм заболевания. Также возможно, аллель HLA-DRB1*15 определяет большую вероятность передачи РС последующим поколениям, т.е. появления новых семейных случаев.

На уровне тенденции отмечена немного более высокая частота аллеля Т полиморфного варианта rs1883832 гена *CD40*, однако не достигшая уровня статистической значимости.

Таким образом, не показано достоверных различий распределения частот полиморфизмов генов цитокинов между группами семейного и спорадического РС (Таблица 8).

Таблица 8

Частотный анализ аллелей исследованных полиморфных локусов в зависимости от семейного анамнеза

Ген	SNP	Аллель	Частота аллеля		χ^2	p
			спорадический	семейный		
CD40	rs6074022	C	23%	22%	0,02	0,89
	rs1883832	T	32%	43%	2,35	0,12
	rs1535045	T	26%	22%	0,47	0,50
	rs11086996	G	1%	2%	0,49	0,42
<i>KIF1B</i>	rs10492972	C	31%	30%	0,01	0,91
	rs3135388	T	33%	44%*	8,56	0,003
TNF- α	rs1800629	A	10%	8%	0,13	0,77
<i>TNFRSF1A</i>	rs4149584	A	2%	0%	0,41	1,00

Дополнительно проведен анализ влияния изученных полиморфизмов на риск развития РС с учетом семейного анамнеза. В подгруппе семейного РС, так же как и спорадического, обнаружены ассоциации тех же полиморфных локусов с риском РС (Табл. 9). Таким образом, *полиморфные варианты rs1883832 CD40 (аллель T) и rs3135388 (аллель T) увеличивают предрасположенность к РС вне зависимости от семейного анамнеза.*

Таблица 9

Частоты встречаемости генотипов и риск-аллелей полиморфных локусов и расчет отношений шансов с учетом семейного анамнеза

SNP	подгруппа	частота генотипа, %			аллель: F _a , %	OR _a [95% CI]	p-value
		T/T	T/C	C/C			
rs6074022 (CD40)	Семейный РС	65,2	26,1	8,7	C	0,90 [0,44-1,83]	0,76
					22%		

SNP	подгруппа	частота генотипа, %			аллель: F _a , %	OR _a [95% CI]	p-value
	Контроль	58,3	36,1	5,6	24%		
rs1883832 (CD40)		C/C	C/T	T/T	T		
	Семейный РС	26,0	60,9	13,1	43%	2,60 [1,43-4,74]	<i>0,001</i>
	Контроль	59,8	34,8	5,4	23%		
rs1535045 (CD40)		C/C	C/T	T/T	T		
	Семейный РС	56,5	43,5	0	22%	0,80 [0,39-1,63]	0,54
	Контроль	55,1	38,3	6,6	26%		
rs11086998 (CD40)		C/C	C/G	G/G	G		
	Семейный РС	95,7	4,3	0	2%	1,24 [0,16-9,44]	1,73
	Контроль	96,5	3,5	0	2%		
rs3135388		C/C	C/T	T/T	T		
	Семейный РС	33,4	44,4	22,2	44%	7,76 [3,90-15,42]	<i>1,41*10⁻⁷</i>
	Контроль	82,5	16,2	1,3	9%		1,00
TNF-α (rs1800629)		G/G	G/A	A/A	A		
	Семейный РС	85	10	5	10%	0,72 [0,25-2,06]	0,54
	Контроль	74,6	24,2	1,2	13%		

Подтверждено наличие клинико-генетических особенностей семейного РС: более мягкое, доброкачественное течение, отсутствием прогрессирующих форм с наибольшей клинической конкордантностью среди sibлингов; более высокая частота аллеля T полиморфизма rs3135388 в группе семейного РС. Необходимы дальнейшие исследования для уточнения молекулярно-генетических особенностей семейных случаев РС и определения прогностической значимости выявленных различий для пациентов и их родственников. Изучение генетики семейных форм, возможно, станет ещё одним шагом к пониманию патогенеза РС.

ВЫВОДЫ

1. В случайной выборке больных рассеянным склерозом из популяции Новосибирской области семейный риск повторяемости составил 6,7%, общий риск повторяемости – 7,6%.

2. В отличие от спорадических семейные случаи рассеянного склероза характеризуются более мягким, доброкачественным течением, отсутствием первично-прогрессирующих форм и наибольшей клинической конкордантностью среди сиблингов.

3. Не выявлено различий в частоте аллельных полиморфизмов изученных генов системы *TNF* между семейными и спорадическими случаями, отмечена достоверно более высокая частота аллеля *T* полиморфизма rs3135388 при семейном рассеянном склерозе.

4. В популяции Новосибирской области шанс развития РС увеличивает носительство аллеля *T* полиморфного локуса rs3135388, аллеля *T* в локусе rs1883832 гена *CD40* и аллеля *G* полиморфизма rs1800629 гена *TNF α* вне зависимости от пола, возраста и семейного анамнеза. Обнаружено, что ассоциация полиморфизма rs1800629 гена *TNF α* с рассеянным склерозом индуцирована HLA-DRB1*15.

5. Выявлено достоверное влияние генетических факторов на фенотипическую экспрессию рассеянного склероза. Благоприятными прогностическими факторами в отношении характера дебюта, медленной скорости прогрессирования и длительной первой ремиссии являются аллели *T* полиморфизмов rs1883832, rs1535045 гена *CD40* и аллель *G* варианта rs1800629 гена *TNF- α* . Риск высокой клинической активности ремитирующего РС возрастает у носителей аллеля *T* полиморфизма rs3135388.

6. Риск развития резистентности к терапии глатирамера ацетатом выше у больных рассеянным склерозом, несущих генотипы *TT* и *TC* полиморфного варианта rs1883832 *CD40* (OR 4.29, CI 1.25-14.74, p=0.018), к терапии ИФН-бета1а в/м – у носителей генотипов *TC*, *CC* в локусе rs6074022 гена *CD40* (OR 5,00, CI 1.39-17.87, p=0.009).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На основании клинико-генетического исследования группой риска по развитию заболевания следует считать ближайших кровных родственников.

2. Рекомендовано генотипирование в группах риска по генам *TNF α* (rs1800629), *CD40* (rs1883832) и полиморфизму rs3135388.

3. Для прогнозирования скорости прогрессирования у больных РС рекомендуется проводить на начальных этапах заболевания генотипирование по полиморфизмам гена *CD40* (rs1883832, rs1535045) и *TNF- α* (rs1800629) для прогнозирования клинической активности ремитирующего рассеянного склероза – генотипирование по полиморфизму rs3135388.

4. Врачам-специалистам в области рассеянного склероза рекомендуется учитывать влияние генетических факторов на клинические характеристики заболевания, использовать данные генотипирования для прогнозирования

дальнейшего течения рассеянного склероза и ответа на иммуномодулирующую терапию первой линии (глатирамера ацетат и интерферон-β_{1a} в/м) и индивидуализированного определения тактики ведения пациента.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Коробко Д.С. Связь полиморфизмов генов цитокинов со скоростью прогрессирования рассеянного склероза / Д. С. Коробко, Е.А. Кудрявцева, Н. А. Малкова, М. Л. Филипенко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2012. – №2. – С. 9-15.
2. Коробко Д.С. Фенотип и генотип семейного рассеянного склероза / Д. С. Коробко, Н. А. Малкова, Е. А. Соколова, М. Л. Филипенко // Медицина и образование в Сибири: электронный научный журнал. — 2012. — № 6.
3. Первые результаты объединенного общероссийского исследования по клинической генетике рассеянного склероза / Е. А. Соколова, Н. А. Малкова, Д. С. Коробко, А. С. Рождественский, А. В. Какуля, Е. В. Ханох, Р. А. Делов, Ф. А. Платонов, Т. Е. Попова, Е. Г. Арефьева, Н. Н. Загорская, В. М. Алифирова, М. А. Титова, И. В. Смагина, С. А. Ельчанинова, А. В. Поповцева, Ю. Н. Личенко, М. А. Дымова, А. С. Вайнер, О. В. Пьянкова, И. П. Оскорбин, А. А. Кечин, В. П. Пузырев, О. Г. Кулакова, Е. Ю. Царева, О. О. Фаворова, С. Г. Щур, Н. Ю. Лащ, Н. Ф. Попова, Е. В. Попова, Е. И. Гусев, А. Н. Бойко, Ю. С. Аульченко, М. Л. Филипенко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013. – №2. – С. 6-9.
4. Влияние генетических факторов на фенотипическую экспрессию рассеянного склероза / Д. С. Коробко, Н. А. Малкова, Е. В. Булатова, Л. А. Бабенко, Д. В. Сазонов, Е. А. Соколова, М. Л. Филипенко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2013. – № 2. – С. 10-16.
5. Коробко Д.С. Достижения и перспективы исследований роли полиморфизмов генов цитокинов в патогенезе рассеянного склероза (обзор) /Д.С. Коробко, Н.А. Малкова // Бюллетень СО РАМН. – 2013. - Т. 33, № 2. – С. 99-108.
6. Коробко Д.С. Генетические и клинические особенности семейного рассеянного склероза в Новосибирске / Д.С. Коробко, Н.А. Малкова, Е.В. Булатова, Е.А. Кудрявцева, М.Л. Филипенко //Материалы 12-й межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы неврологии» с обсуждением смежных вопросов неврологии и медицинской генетики. – Новосибирск, 2012. – с. 50-55.
7. Коробко Д.С. Генетический анализ семейных случаев рассеянного склероза / Д.С. Коробко, Н.А. Малкова, Е.А. Кудрявцева, М.Л. Филипенко // Материалы X Всероссийского съезда неврологов с международным участием. – Н. Новгород, 2012. – с.223.
8. Генетика рассеянного склероза / Е.А. Кудрявцева, А.С. Рождественский, А.В. Какуля, Е.В. Ханох, Р.А. Делов, Н.А. Малкова, Д.С. Коробко, Ф.А. Платонов, Е.Г. Арефьева, Н.Н. Загорская, А.М. Алифирова, С.А. Бабенко, И.В. Смагина,

- С.А. Ельчанинова, А.Г. Золовкина, О.О. Фаворова, В.П. Пузырев, А.Н. Бойко, М.Л. Филипенко // Рассеянный склероз: 30 лет спустя»: материалы V Сибирской межрегиональной научно-практической конференции. – Новосибирск: НГМУ, 2011. – с.32-33.
9. Коробко Д.С. Исследование роли полиморфизмов генов цитокинов как предикторов тяжести рассеянного склероза / Д. С. Коробко, Е.А. Кудрявцева, Н. А. Малкова, М. Л. Филипенко // Рассеянный склероз: 30 лет спустя»: материалы V Сибирской межрегиональной научно-практической конференции. – Новосибирск: НГМУ, 2011. – с.34-40.
10. Коробко Д.С. Опыт применения препарата интерферона-бета-1а для внутримышечного введения в новосибирском областном Центре рассеянного склероза / Д. С. Коробко, Д.В. Сазонов, Н.А. Малкова // Рассеянный склероз: 30 лет спустя»: материалы V Сибирской межрегиональной научно-практической конференции. – Новосибирск: НГМУ, 2011. – с.139-143.
11. Коробко Д.С. Молекулярно-генетическое исследование семейных случаев рассеянного склероза: полиморфизмы генов цитокинов / Д.С. Коробко, Н.А. Малкова, Е.А. Соколова, М.Л. Филипенко// Рассеянный склероз и другие аутоиммунные заболевания нервной системы: материалы VI Сибирской межрегиональной научно-практической конференции. – Новосибирск: НГМУ, 2013. – с.75-82.
12. Polymorphic locus rs10492972 of the KIF1B gene association with multiple sclerosis in Russia: Case control study /E.A. Kudryavtseva, A.S. Rozhdestvenskii, A.V. Kakulya, E.V. Khanokh, R.A. Delov, N.A. Malkova, **D.S. Korobko** et al. // Molecular Genetics and Metabolism – 2011. – Vol. 104. – P. 390–394.
13. Korobko D.S. Genetics and disease progression of familial multiple sclerosis in Novosibirsk Region of Russia / **D.S. Korobko**, N.A. Malkova, E.A. Kudryavtseva, M.L. Filipenko // Abstracts of the Eighth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology. Novosibirsk, 2012. – P. 159.
14. Kudryavtseva E.A. Is the association between -308G->A TNF α and multiple sclerosis independent of HLA-DRB1*15? /E.A. Kudryavtseva, A.S. Rozhdestvenskii, A.V. Kakulya, E.V. Khanokh, N.A. Malkova, **D.S. Korobko**, F.A. Platonov, E.G. Aref'eva, N.N. Zagorskaya, V.M. Alifirova, M.A. Titova, I.V. Smagina, S.A. El'chaninova, A.G. Zolovkina, V.P. Puzyrev, E.Y. Tsareva, O.O. Favorova, A.N. Boiko, M.L. Filipenko // Abstracts of the Eighth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology. Novosibirsk, 2012. – P. 172.
15. Association of CD40 gene polymorphisms with the multiple sclerosis in population of Russian Federation / E.A. Kudryavtseva, A.S. Rozhdestvenskii, A.V. Kakulya, E.V. Khanokh, N.A. Malkova, **D.S. Korobko**, F.A. Platonov, E.G. Aref'eva, N.N. Zagorskaya, V.M. Alifirova, M. Titova, V.P. Puzyrev, I.V. Smagina, S.A. El'chaninova, A.G. Zolovkina, E.Y. Tsareva, O.O. Favorova, A.N. Boiko, M.L. Filipenko // Mult Scler. 2012. – Vol. 18, № 4. – Suppl. 55-277. – P341.

16. Association of SNPs of CD40 Gene with Multiple Sclerosis in Russians / E.A. Sokolova, N.A. Malkova, **D.S. Korobko**, A.S. Rozhdestvenskii, A.V. Kakulya et al. // PLoS ONE. 2013. – Vol. 8, N4: e61032. doi:10.1371/journal.pone.0061032.
17. Korobko D. Genetic associations and clinical course of familial multiple sclerosis in Novosibirsk region of Russia / **D. Korobko**, N. Malkova E. Sokolova, M. Filipenko. // J. Neurol. – 2013. – Vol. 260. – Supp. 1. – P840.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВППС – вторично-прогрессирующий рассеянный склероз
ГКГ – главный комплекс гистосовместимости
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФН-бета1а – интерферон-бета1а
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МРТ – магнитно-резонансная томография
ОБМ – основной белок миелина
ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза
ППРС – первично-прогрессирующий рассеянный склероз
ПЦР - полимеразная цепная реакция
РППС – ремитирующе-прогредиентный рассеянный склероз
РРС – ремитирующий рассеянный склероз
РС – рассеянный склероз
СМЖ – спинномозговая жидкость
СНД – сумма неврологического дефицита
СЧО – среднегодовая частота обострений
ЭАЭ – экспериментальный аллергический энцефалит
95% CI - 95%-ный доверительный интервал
CD40 - рецептор антигенпрезентирующих клеток
EDSS (Expanded Disability Status Scale) - расширенная шкала инвалидизации
Fa – частота аллеля
FS – функциональные системы
GWAS – полногеномный скрининг ассоциаций
HLA, Human Leucocyte Antigens – главный комплекс гистосовместимости у людей
IFN – интерферон
IMSGC – Международный Консорциум по генетике рассеянного склероза
KIF1B - белок семейства кинезинов
МНС – главный комплекс гистосовместимости
MSSS, Multiple Sclerosis Severity Score – балл по шкале тяжести РС
OR – отношение шансов
p-value – уровень статистической значимости
SNP (single nucleotide polymorphism) - однонуклеотидный полиморфизм
Th - Т-хелперы
TNFRSF1A – рецептор первого типа фактора некроза опухолей альфа
TNF- α - фактор некроза опухолей альфа