



**ФРЕЙДИН
МАКСИМ БОРИСОВИЧ**

**ПАТОГЕНЕТИКА АЛЛЕРГИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ:
СИНТРОПНЫЕ ГЕНЫ, ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ,
МЕЖГЕННЫЕ И ГЕННО-СРЕДОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ**

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Томск - 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук и Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН

Пузырев Валерий Павлович

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН

Огородова Людмила Михайловна

Официальные оппоненты:

Гинтер Евгений Константинович, доктор биологических наук, профессор, академик РАМН; Федеральное государственное бюджетное учреждение «Медико-генетический научный центр» Российской академии медицинских наук, руководитель научно-консультативного отделения

Коненков Владимир Иосифович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН; Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, заведующий лабораторией клинической иммуногенетики

Букреева Екатерина Борисовна, доктор медицинских наук, профессор; Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры внутренних болезней

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 2013 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Московский тракт, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ медицинской генетики» СО РАМН (634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, 10).

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

И.Ю. Хитринская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Геномные исследования многофакторных заболеваний (МФЗ) являются приоритетным направлением современной медицинской генетики (Гинтер, 2003; Пузырев, 2011; Khoury, Gwinn, 2006; Gibson, 2009; Manolio et al., 2009). Это определяется двумя важными обстоятельствами. Во-первых, МФЗ составляют основную проблему здравоохранения во всем мире; предполагается, что понимание наследственных основ их этиологии и патогенеза поможет в формировании новых стратегий лечения и профилактики таких проблемных патологий, как сердечно-сосудистые, аллергические, инфекционные, аутоиммунные, психиатрические болезни. Во-вторых, МФЗ представляют собой комплексные фенотипы, генетический анализ которых может способствовать пониманию механизмов реализации наследственной информации на уровне сложных признаков, что является важной, нерешенной сегодня биологической проблемой, заключающейся в неоднозначности соответствия генотипа и фенотипа, в его вероятностном характере, основанном на многоступенчатости реализации генетической информации. В этом – основное отличие МФЗ от моногенных и хромосомных болезней, для которых гено-фенотипические взаимоотношения имеют детерминистский характер. В медико-биологических исследованиях ближе всего к анализу этой проблемы стоит понятие патогенетики, обозначающее генетические механизмы развития патологических признаков, то есть превращение аномального генома в фенотип болезни (Пузырев, 2001; Murphy, Pyeritz, 1996).

Последние десятилетия развития генетики и смежным дисциплин как в фундаментальном, так и в медицинском аспекте позволили накопить существенный объем фактических данных, касающихся патогенетики многих МФЗ. Совершен прорыв в технологиях генотипирования и секвенирования, которые теперь позволяют получить полную последовательность человеческого генома почти за сутки в условиях одной лаборатории (Kilpinen, Barrett., 2013). Аналогичным образом прогрессируют технологии масштабного анализа транскриптома, протеома, метаболома и других «омов» (Russell et al., 2013). Накопление огромных массивов биологических данных дает мощный стимул развитию биоинформатики, вычислительной биологии и многомерных статистических методов анализа биологических явлений (Goodman, 2002; Molitor

et al., 2003; Furlong, 2013). Накапливающиеся фактические данные по результатам генотипирования, анализа экспрессионного профилирования и других способов изучения молекулярной и фенотипической изменчивости архивируются в публично доступные базы и банки данных и знаний, позволяя проводить мета-анализ и получать информацию с помощью методов извлечения данных (Sommer et al., 2008; Yu et al., 2008). Отмечается рост интереса к рассмотрению проблемы генетики МФЗ с позиции системной биологии и сетевой медицины (Auffray et al., 2009; Chuang et al., 2010; Varabasi et al., 2011; Bousquet et al., 2011). Это позволяет говорить о смене парадигмы в исследовании сложного наследуемых заболеваний и признаков – от редукционизма к холизму. К этому можно добавить тенденцию к рассмотрению в рамках одного исследования не отдельных болезней, а их групп, объединенных по принципам этиологического и патогенетического родства. Целью таких исследований является выявление общих и специфических генов, лежащих в основе целого ряда болезней. Очевидно, что такой подход будет способствовать не только лучшему пониманию механизмов развития МФЗ, но и поможет в создании естественной системы классификации болезней.

В контексте генетических исследований МФЗ аллергические болезни являются своего рода парадигмой, поскольку на их примере можно отследить все основные направления и идеи такого рода работ (Koppelman et al., 2008; Vercelli, 2008, 2011; Chuang et al., 2009; Maes et al., 2011; Zhang et al., 2012). Нужно отметить значительный вклад российских ученых в исследования наследственных основ аллергических болезней (Вавилин и соавт., 2002; Полоников и соавт., 2005; Карпова и соавт., 2007; Коненков и соавт., 2007; Огородова и соавт., 2007; Баранов и соавт., 2008; Черкашина и соавт., 2010; Тюменцева, 2011; Макарова, 2011; Карунас, 2012).

Отмечая несомненные успехи в области исследования генетики аллергических болезней, нужно указать на ряд трудностей и пробелов в существующих знаниях и методологии. Во-первых, очевидным фактом является недостаточность исследований межгенных и генно-средовых взаимодействий. Хотя роль факторов внешней среды в модификации генетических эффектов в развитии аллергических болезней не вызывает сомнений, непосредственные исследования этой проблемы немногочисленны и касаются в основном анализа факторов сельского образа жизни в рамках «гигиенической гипотезы» (von Mutius, Vercelli, 2010; Ober, Vercelli, 2011). Относительно межгенных

взаимодействий можно отметить значительный теоретический интерес, пока что слабо поддерживаемый фактическими экспериментальными данными (Cordell, 2009). Во-вторых, многочисленные полногеномные ассоциативные исследования, выполненные для аллергических болезней и признаков, показывают наличие выраженной этнической и популяционной специфики выявляемых ассоциаций (Willis-Owen et al., 2009; Akhabir, Sandford, 2011; Torgerson et al., 2011; Wjst et al., 2013). Это диктует необходимость систематического анализа ассоциаций в рамках полногеномного подхода в различных популяциях мира, учитывающих этническую специфику, а также факторы внешней среды. Во-третьих, хотя родственный характер аллергических болезней очевиден, до сих пор сделано мало попыток по выявлению их общих наследственных детерминант. Также практически отсутствуют работы по установлению общности генетической компоненты аллергических и других болезней. Такого рода анализ будет полезен для целей построения естественной классификации МФЗ. Среди перспективных направлений теоретических изысканий в этой области можно выделить концепцию болезней-синтропий, дающую ориентиры для выявления общих (синтропных) генов групп патогенетических общих, часто сочетающихся болезней, к которым, несомненно, относятся аллергические заболевания (Пузырев, 2008; Пузырев и соавт. 2009). Наконец, очевидно, что необходимы усилия в области практических приложений достижений генетических исследований аллергических болезней. В частности, перспективными, хотя и слабо разрабатываемыми, являются оценки предиктивной и диагностической значимости генетических маркеров с доказанной ассоциацией с аллергическими болезнями. Учитывая эти обстоятельства, сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования: Комплексный анализ патогенетики синтропных аллергических болезней на основе исследования полногеномных ассоциаций, межгенных и генно-средовых взаимодействий.

Задачи исследования:

1. С помощью интернет-ресурса HuGE Navigator установить синтропные и специфичные гены распространенных аллергических заболеваний (бронхиальная астма, атопический дерматит, аллергический ринит, лекарственная и пищевая аллергия, поллиноз, крапивница). Охарактеризовать

сферу компетенции общих и специфических генов аллергических заболеваний путем анализа генных онтологий и KEGG-путей.

2. Провести сопоставление генетической компоненты аллергических болезней и других распространенных многофакторных заболеваний (аутоиммунных, инфекционных, метаболических).
3. Провести полногеномный анализ ассоциаций генетических маркеров с аллергическими фенотипами у жителей Западной Сибири. Провести валидацию результатов полногеномного анализа ассоциаций в независимых выборках.
4. Оценить влияние описторхозной инвазии на особенности течения аллергического воспаления. Проанализировать частоту аллелей и гаплотипическую структуру полиморфных вариантов генов-модификаторов иммунного ответа *IFNGR2* (rs17880053), *TBX21* (rs11652969), *STAT5B* (rs16967593), *IL4RA* (rs1805010), *IFNG* (rs2069705), *PIAS4* (rs3760903), *SOCS5* (rs6737848), *IL4* (rs2070874), *GATA3* (rs10905277), *PIAS3* (rs12756687) у жителей Томской области, дифференцированных по наличию аллергического заболевания (бронхиальной астмы) и описторхоза. Провести анализ ассоциации полиморфизмов генов-модификаторов иммунного ответа с аллергическими фенотипами с учетом описторхозной инвазии в качестве внешнесредового фактора.
5. С помощью подхода Multifactor Dimensionality Reduction построить модели межгенных и генно-средовых взаимодействий, существенных в развитии аллергических заболеваний, и оценить их предикторную и диагностическую значимость.

Научная новизна: Данные, полученные в ходе исследования, развивают генетический аспект концепции синтропных болезней и дополняют знания об основах патогенетики аллергических болезней. Впервые установлены синтропные гены распространенных аллергических заболеваний (*TNF*, *IL13*, *IL4*, *IL4R*, *TGFB1*, *MS4A2*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *CD14*, *LTC4S*, *IL10*, *TLR2*, *CTLA4*, *HLA-DQA1*) и предложена классификация аллергических болезней на основе данных об общих и специфических генах. Установлено положение аллергических болезней среди других многофакторных заболеваний по степени участия одних и тех же генов в их развитии, в частности показано, что по общности генной компоненты аллергические болезни ближе к инфекционным, чем к аутоиммунным

патологиям. С помощью полногеномного анализа ассоциаций выявлены новые гены-кандидаты детской бронхиальной астмы (*YWHAB* и *PPP1R12B*) и аллергического ринита (*KCNE4*). Установлено влияние описторхозной инвазии на особенности течения аллергического воспаления, а также ее значительная роль в системе генно-средовых взаимодействий, существенных в развитии аллергических фенотипов. В качестве генетических факторов в этой системе наибольшее значение имеют полиморфизмы генов *IFNG* и *SOCS5*. С помощью процедуры MB-MDR получены модели межгенных и генно-средовых взаимодействий, имеющих существенное значение в развитии аллергии. В целом, полученные данные позволили впервые охарактеризовать общие и специфические гены синтропии «аллергические болезни», выявить новые гены-кандидаты аллергических заболеваний, установить ранее не известные ассоциации с генами-модификаторами иммунного ответа, а также показать важность межгенных взаимодействий и коморбидности, как компонента генно-средовых взаимодействий в развитии аллергических фенотипов.

Научно-практическая значимость работы: По результатам исследования зарегистрированы два патента на изобретение: «Способ прогнозирования риска развития бронхиальной астмы» (патент на изобретение № 2383019; приоритет изобретения 09.12.2008) и «Способ прогнозирования риска развития терапевтической резистентности у больных бронхиальной астмой» (патент на изобретение № 2433401; приоритет изобретения 15.07.2010). Данные работы, касающиеся генно-средовых взаимодействий с учетом описторхоза в качестве фактора внешней среды, могут быть учтены при разработке профилактических и диагностических мероприятий, а также приняты во внимание при построении эпидемиологических моделей для аллергических болезней в регионах, эндемичных по описторхозу. Модели межгенных и генно-средовых взаимодействий могут быть использованы в качестве ориентира при разработке способов генодиагностики аллергических болезней. Результаты исследования дополнили учебные программы для врачей-интернов, врачей-ординаторов кафедры факультетской педиатрии, а также для студентов кафедры медицинской генетики Сибирского государственного медицинского университета. Новые данные могут быть использованы в учебном процессе на факультетах биологического и медицинского профиля других вузов. Новые научные

результаты запрошены и переданы для размещения в УМКД по педиатрии для образовательных стандартов нового поколения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Генетическая компонента подверженности аллергическим заболеваниям представлена синтропными и специфическими генами. Сферой компетенции синтропных генов является инициация и регуляция иммунного ответа (преимущественно гуморального) в процессе аллергического воспаления, а также регуляция противoinфекционного иммунитета, в то время как специфические гены связаны с характерными для каждой болезни фенотипическими проявлениями (гладко-мышечное сокращение для бронхиальной астмы; развитие покровных тканей для атопического дерматита; реакции биотрансформации для лекарственной аллергии).
2. Аллергические болезни имеют общие гены с аутоиммунными, воспалительными, инфекционными, паразитарными и метаболическими болезнями. Большинство этих генов связано с регуляцией иммунного ответа и воспаления. По общности генетической компоненты подверженности аллергические заболевания близки к инфекционным болезням и дистанцированы от аутоиммунных патологий.
3. Детская бронхиальная астма ассоциирована с полиморфными вариантами гена *PPP1R12B* (1q32.1). Аллергический ринит связан с полиморфными вариантами гена *KCNE4* (2q36.1); коморбидность с бронхиальной астмой важна для фенотипического выражения этой ассоциации.
4. Изменчивость аллергических фенотипов связана с межгенными и генно-средовыми взаимодействиями. Существенным компонентом системы генно-средовых взаимодействий является гельминтная инвазия *Opisthorchis felinus*; к генетическим факторам этой системы относятся: для бронхиальной астмы – *IFNG* и *SOCS5*; для атопического дерматита – *GATA3* и *IL4*; для аллергического ринита – *TBX21* и *SOCS5*; для поливалентной сенсibilизации – *IFNG* и *IL4RA*; для тяжести течения бронхиальной астмы – *IFNG* и *PIAS3*.
5. Межгенные и генно-средовые комбинации, включающие гены-модификаторы иммунного ответа и описторхозную инвазию, имеют диагностическую и прогностическую ценность в отношении оценки риска бронхиальной астмы и тяжести ее течения, атопического дерматита и поливалентной сенсibilизации.

Апробация работы: Основные положения диссертации представлены на межлабораторных семинарах НИИ медицинской генетики СО РАМН (г. Томск), а также на российских и международных конференциях: конференция по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (Москва, 2008), VI Съезд Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), конференции Европейского общества генетиков человека (Барселона, 2008; Нюрнберг, 2012), III и VI международные конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, 2007, 2009), научно-практическая конференция «Вопросы сохранения и развития здоровья населения Севера и Сибири» (Красноярск, 2012), конгресс Американского общества генетиков человека (Сан-Франциско, 2012), 8-я Международная конференция по биоинформатике геномной регуляции и структурной / системной биологии (Новосибирск, 2012), ежегодный конгресс Европейского респираторного общества (Вена, 2012), III международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012).

Декларация личного участия автора: В диссертационной работе использованы экспериментальные и аналитические материалы, полученные лично автором или под его непосредственным руководством. Автор являлся участником, организатором и куратором сбора биологического материала, а также координатором взаимодействия между российскими и европейскими организациями в рамках международных проектов, по результатам которых выполнен фрагмент диссертационной работы; выбирал гены и полиморфизмы для исследования; разрабатывал способ генотипирования маркеров генов-кандидатов аллергических болезней; проводил анализ баз данных по генам МФЗ; осуществлял статистический и биоинформатический анализ результатов; оформлял результаты исследований в виде статей.

Результаты, представленные в диссертации, получены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №06-04-58574, 05-04-98011-р_объ_а, 03-04-06053, 02-04-06911, 01-04-48213); грантов Президента РФ (МК-1287.2005.4, ВНШ-840.2003.4); ФЦНТП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники»

(госконтракты № 02.740.11.0716, 02.512.11.2281, 02.512.11.2162, 02.434.11.7117, 02.445.11.7001, соглашение № 8156); Администрации Томской области (проекты «Разработка генотипической тест-системы прогнозирования тяжести течения бронхиальной астмы», 2002-2003; «Формирование и развитие рынка услуг по геномной диагностике широко распространенных заболеваний», 2006); фонда INTAS (грант 05-1000004-7761); 6-й Рамочной программы Европейского Сообщества (грант LSH-2004-1.2.5-1 «GABRIEL»); фонда Wellcome Trust (грант № WT084703MA).

Публикации: По теме диссертационного исследования опубликована 41 научная работа, в том числе 22 статьи в рецензируемых научных журналах, 3 главы в коллективных монографиях, 1 учебное пособие, 13 тезисов в материалах зарубежных и отечественных конференций и 2 патента на изобретение.

Структура и объем работы: Диссертация состоит из введения, обзора литературы, трех глав с результатами собственных исследований, включающих подразделы с описанием материала и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы включающего 502 источника (37 – отечественных и 465 – зарубежных авторов), и приложения. Диссертация изложена на 303 страницах, содержит 41 таблицу и 32 рисунка.

1. АНАЛИЗ ОБЩИХ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Концепция синтропных и дистропных болезней фиксирует феномен взаимной склонности (синтропия) или «отталкивания» двух болезней в отношении совместного проявления (Pfaundler, von Seht, 1921). В современном звучании синтропия трактуется как природно-видовое явление сочетания двух и более патологических состояний у индивидуума и его ближайших родственников, неслучайное и имеющее эволюционно-генетическую основу (Пузырев, 2008). Гены, обуславливающие развитие синтропий названы «синтропными генами» (Пузырев, 2008; Пузырев и соавт., 2009). Аллергические заболевания (АЗ) являются примером синтропных болезней, что подтверждается их общим патогенезом, семейным накоплением, тенденцией к совместному проявлению друг с другом (Ellis et al., 2003; Annesi-Maesano et al., 2006; Ricci et al., 2006; Кароор et al., 2008; Yuksel et al., 2008), последовательной сменой в онтогенезе («атопический марш») (Gustaffson et al., 2000; Johansson et al., 2001). Нами

проведен поиск синтропных и специфических генов АЗ с помощью интегрированной базы данных и знаний по генетическим ассоциациям и эпидемиологии генома человека HuGE Navigator (Yu et al., 2008).

1.1. Методы исследования

Для выявления общих и специфических генов с помощью HuGE Navigator (<http://www.hugenavigator.net>) использовали соответствующие поисковые запросы (англоязычные названия заболеваний). Программа ранжирует гены в соответствии с баллом, отражающим степень изученности отдельного гена по отношению ко всем генам, проанализированным в связи с исследуемым фенотипом. В качестве критерия принятия гена к рассмотрению использовали величину балла не менее 0,01, а также наличие хотя бы одного положительного результата анализа ассоциаций (включая полногеномные исследования). Все гены для всех заболеваний, прошедшие эти фильтры, были сведены в общую таблицу с указанием наличия или отсутствия данных об их ассоциации для всех болезней и признаков. На основании этой таблицы были выделены общие и специфические гены для разных болезней и построена бинарная матрица сходства, которую затем использовали для кластерного анализа и многомерного шкалирования (Сошникова Л.А. и соавт., 1999). Анализ проведен в программной среде R (R Development Core Team, 2011). Для установления функциональной роли групп общих и специфических генов с помощью интернет-программы DAVID (Huang D.W. et al., 2009) проведен анализ генных онтологий и выявление функциональных генных кластеров, а также поиск включения генов в метаболические пути по базе данных KEGG (Kanehisa et al., 2012).

1.2. Результаты и обсуждение

Общие гены аллергических болезней. С помощью запросов программы HuGE Navigator, проведен поиск синтропных и специфических генов АЗ: бронхиальная астма (БА), атопический дерматит (АД), аллергических ринит (АР), пищевая аллергия (ПА), лекарственная аллергия (ЛА), поллиноз и крапивница. Кроме того, в анализ включили уровень IgE, поскольку опосредованная антителами этого класса аллергия является наиболее частой. Для БА найдено 803 гена, в том числе 141 со значением $\text{score} \geq 0,01$ и с наличием хотя бы одного положительного исследования по анализу ассоциаций; для АД – 156 и 146

соответственно; для АР – 169 и 154 соответственно; для ПА – 42 и 28 соответственно, для ЛА – 118 и 100 соответственно, для поллиноза – 81 и 79 соответственно, для крапивницы 51 и 72 соответственно; и для уровня IgE – 648 и 105 соответственно. Восемь генов оказались общими для всех исследованных АЗ и уровня IgE: *TNF*, *IL13*, *IL4*, *IL4R*, *TGFB1*, *MS4A2*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1* (табл. 1). Эти гены могут быть названы синтропными генами АЗ. Еще шесть генов связаны с семьей из восьми исследованных состояний: *CD14*, *LTC4S*, *IL10*, *TLR2*, *CTLA4*, *HLA-DQA1* (табл. 1). Учитывая, что одним из обстоятельств, осложняющих такого рода анализ, является недостаточная изученность генов в связи с конкретной патологией, можно предположить, что эти шесть генов также являются синтропными для АЗ.

Таблица 1 – Синтропные гены аллергических заболеваний и уровня IgE

Ген	Продукт гена	Хромосомная локализация
<i>IL13</i>	Интерлейкин-13	5q31
<i>IL4</i>	Интерлейкин-4	5q31.1
<i>CD14*</i>	Ко-рецептор лейкоцитов CD14	5q31.3
<i>IL4RA</i>	α -цепь рецептора к интерлейкину-4	16p12.1-p11.2
<i>TNF</i>	Фактор некроза опухолей	6p21
<i>HLA-DQB1</i>	Антиген гистосовместимости II класса DQ β 1	6p21.3
<i>IL10**</i>	Интерлейкин-10	1q31-q32
<i>MS4A2</i>	Fc фрагмент высокоаффинного рецептора IgE	11q13
<i>TGFB1</i>	Трансформирующий ростовый фактор- β 1	19q13.2
<i>HLA-DRB1</i>	Антиген гистосовместимости II класса DR β 1	6p21.3
<i>TLR2*</i>	Toll-like рецептор-2	4q31.3
<i>CTLA4***</i>	Антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов	2q33.2
<i>LTC4S***</i>	Лейкотриен C4 синтаза	5q35
<i>HLA-DQA1***</i>	Антиген гистосовместимости II класса DQ α 1	6p21.3

Примечание. * – нет данных об ассоциации гена с крапивницей; ** – нет данных об ассоциации гена с поллинозом; *** – нет данных об ассоциации гена с пищевой аллергией.

Функциональной сферой компетенции синтропных генов АЗ является инициация и регуляция иммунного ответа и воспаления, а также противоинфекционный иммунитет. В частности, согласно базе KEGG, эти гены связаны с путями, имеющими отношение к иммунному ответу, иммунозависимым и инфекционным заболеваниям различной этиологии (табл. 2).

Таблица 2 – Примеры метаболических и патогенетических путей, связанных с синтропными генами аллергических болезней

Код KEGG	Название пути	Гены
hsa05310	Астма	<i>HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL4, IL10, IL13, MS4A2, TNF</i>
hsa05152	Туберкулез	<i>CD14, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL10, TGFB, TLR2, TNF</i>
hsa05140	Лейшманиоз	<i>HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL4, IL10, TGFB, TLR2, TNF</i>
hsa05145	Токсоплазмоз	<i>HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL10, TGFB, TLR2, TNF</i>
hsa05323	Ревматоидный артрит	<i>CTLA4, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, TGFB, TLR2, TNF</i>
hsa04060	Взаимодействие цитокинов с рецепторами	<i>IL4, IL4RA, IL10, IL13, TGFB, TNF</i>
hsa05330	Отторжение трансплантата	<i>HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL4, IL10, TNF</i>
hsa04672	Желудочно-кишечная сеть продукции IgA	<i>HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL4, IL10, TGFB</i>
hsa05320	Аутоиммунный тиреоидит	<i>CTLA4, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, IL4, IL10</i>
hsa04640	Гематопозитические клетки	<i>CD14, HLA-DRB1, IL4, IL4RA, TNF</i>

Для обобщенной характеристики наследственной компоненты разных АЗ использовали кластерный анализ и многомерное шкалирование, дифференцирующие их по группам по общности и специфичности ассоциированных с ними генов. Выявлено два крупных кластера (рис. 1): первый включает IgE, БА, АД, АР и поллиноз, второй – крапивницу, ПА и ЛА. Первый кластер включает два подкластера: в один входят сезонные АЗ (АР и поллиноз), в другой – БА, АД и IgE.

Очевидно, что кластеризация АЗ совпадает с имеющимися представлениями об их этиологии и патогенезе. Так, АД часто сопутствует БА и является ее фактором риска в связи с общим патогенетическим механизмом развития, характеризующимся «атопическим маршем». БА относится к заболеваниям, наиболее часто сопутствующим АД (Ellis et al., 2003). В первом кластере по доле общих генов уровень IgE ближе к БА, что объясняется тем, что для АД также значительна роль генов, продукты которых обеспечивают проницаемость эпителия (Cookson, 2004) и регуляцию воспаления, не связанного

с реагиновыми антителами, особенно на стадии хронизации заболевания (Novak et al., 2007). Кластеризация АР и поллиноза, очевидно, связана с общностью аллергенов и сезонностью проявления. Кроме того, поллиноз является синонимом риноконъюнктивального синдрома, то есть АР и поллиноз, по сути, одно и то же заболевание. Наконец, объединение крапивницы, ПА и ЛА в один подкластер связано, видимо, с общим путем доставки аллергенов – алиментарным, а также с другими общими механизмами патогенеза, в том числе не имеющими отношения к IgE, например, с вовлечением системы комплемента. Кроме того, крапивница, наряду с отеком Квинке, известна как один из частых симптомов проявления ПА (Eriksson et al., 2004; Colver et al., 2005; Thong et al., 2007).

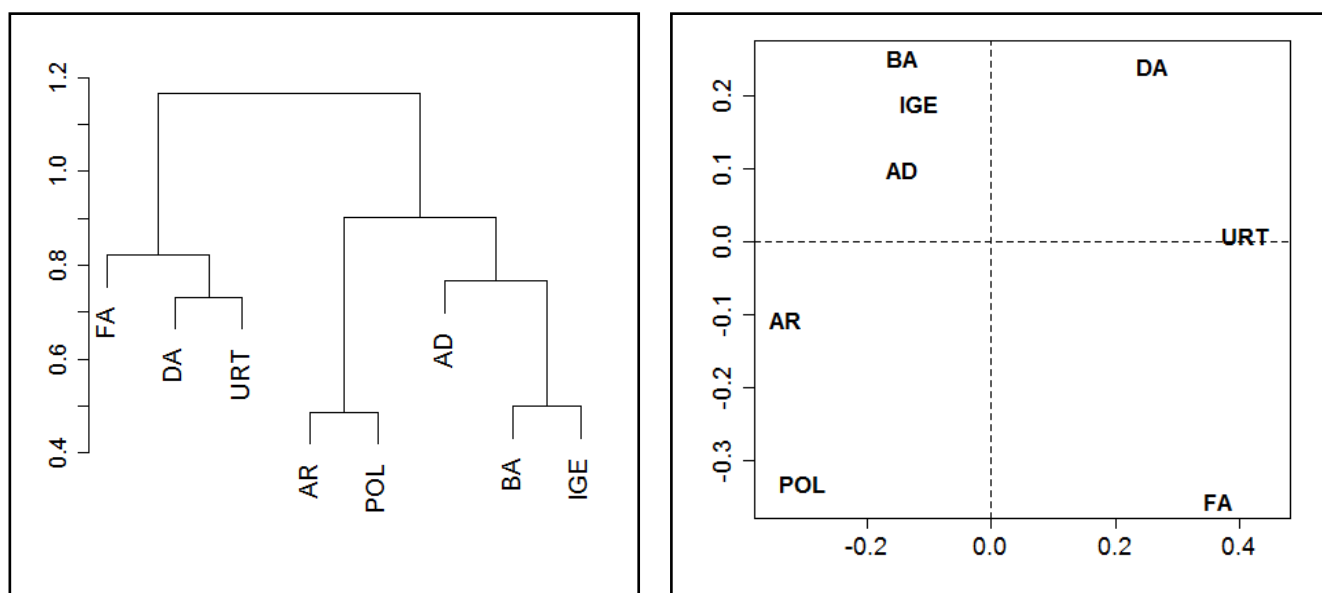


Рис. 1 – Кластеризация (слева) и многомерное шкалирование (справа) аллергических заболеваний, по данным об общности ассоциированных с ними генов. Обозначения: BA – бронхиальная астма; AD – атопический дерматит; AR – аллергический ринит; POL – поллиноз; URT – крапивница; DA – лекарственная аллергия; FA – пищевая аллергия; IgE – уровень иммуноглобулина-Е.

Таким образом, кластеризация по степени общности наследственной компоненты АЗ, построенная без априорных предположений на основании данных о генетических ассоциациях, подтверждает правомочность клинической классификации и ее естественный характер. Представленный подход может быть использован для анализа генетической кластеризации всего многообразия нозологий человека для построения естественной генетической системы их классификации, что позволит лучше понять их этиологию и патогенез. Для развития этой идеи проведен анализ генетической кластеризации исследуемых АЗ

и ряда распространенных многофакторных болезней различного генеза, включая метаболические нарушения, инфекционные болезни разной этиологии, аутоиммунные и воспалительные заболевания. Для АЗ и других заболеваний проанализированы 1282 гена. Единственным общим геном для всех болезней и признаков оказался *TNF*, кодирующий фактор некроза опухолей. Очевидно, его сфера компетенции чрезвычайно велика. Вместе с *TNF*, девятнадцать генов оказались общими для 20 и более исследованных заболеваний и признаков (табл. 3). Все они, кроме двух (*ACE* и *MTHFR*), напрямую связаны с регуляцией иммунного ответа и воспаления.

Кластерный анализ показал распределение АЗ по двум группам: первая, независимая от других болезней, включает только АЗ с выраженной реакиновой компонентой патогенеза (БА, АД, АР, поллиноз) и уровень IgE; вторая, наряду с АЗ (ПА, ДА, крапивница) содержит инфекционные заболевания разной этиологии, включая вирусы, бактерии, простейшие и гельминты. Таким образом, можно констатировать неоднородность АЗ в плане их генетических взаимоотношений с другими болезнями (рис. 2). Многомерное шкалирование (рис. 3) позволяет выделить дополнительную сложность отношений между исследуемыми заболеваниями. В пространстве первой координаты оказываются разделенными все АЗ и большинство инфекционных заболеваний, с одной стороны, и все аутоиммунные заболевания, с другой. В пространстве второй координаты аутоиммунные и большинство инфекционных заболеваний, а также ПА и крапивница имеют больше общего между собой. Такие болезни, как туберкулез, эндометриоз, остеопороз, инфекция *Helicobacter* и ХОБЛ ориентированы ближе к центру пересечения координат, свидетельствуя о том, что их генетическая составляющая имеет много общего со всеми остальными заболеваниями.

Многомерное шкалирование свидетельствует о полярности на молекулярном уровне большинства аллергических и аутоиммунных заболеваний и о сравнительно более выраженной близости генетической компоненты АЗ к таковой для инфекционных болезней, включая паразитарные и глистные инвазии.

Таким образом, по результатам проведенного исследования удалось выявить синтропные гены АЗ и оценить их функциональную сферу компетенции. Кроме того, получены данные, свидетельствующие о генетической неоднородности АЗ в пространстве их молекулярных взаимоотношений с другими болезнями.

Таблица 3 – Общие гены аллергий и других многофакторных заболеваний

Ген	Продукт гена	Хромосомная локализация	Количество ассоциированных болезней
<i>TNF</i>	Фактор некроза опухолей	6p21	31
<i>IL10</i>	Интерлейкин-10	1q31-q32	29
<i>IL4</i>	Интерлейкин-4	5q31	28
<i>HLA-DRB1</i>	Антиген гистосовместимости II класса DR β 1	6p21.3	28
<i>HLA-DQB1</i>	Антиген гистосовместимости II класса DQ β 1	6p21.3	28
<i>HLA-DQA1</i>	Антиген гистосовместимости II класса DQ α 1	6p21.3	27
<i>TGFB1</i>	Трансформирующий ростовый фактор- β 1	19q13.2	26
<i>IL6</i>	Интерлейкин-6	7p21	26
<i>LTA</i>	Лимфотоксин- α	6p21	25
<i>CTLA4</i>	Антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов	2q33.2	24
<i>IL1RN</i>	Рецепторный антагонист интерлейкина-1	2q14.2	24
<i>IL1B</i>	Интерлейкин-1 β	2q14	24
<i>ACE</i>	Ангиотензин I конвертирующий фермент	17q23.3	23
<i>HLA-B</i>	Антиген гистосовместимости I класса, B	6p21.3	21
<i>MTHFR</i>	Метилентетрагидрофолат редуктаза	1p36.3	21
<i>TLR4</i>	Toll-like рецептор-4	9q33.1	20
<i>IFNG</i>	Интерферон- γ	12q14	20
<i>IL1A</i>	Интерлейкин-1 α	2q14	20
<i>HLA-A</i>	Антиген гистосовместимости I класса, A	6p21.3	20

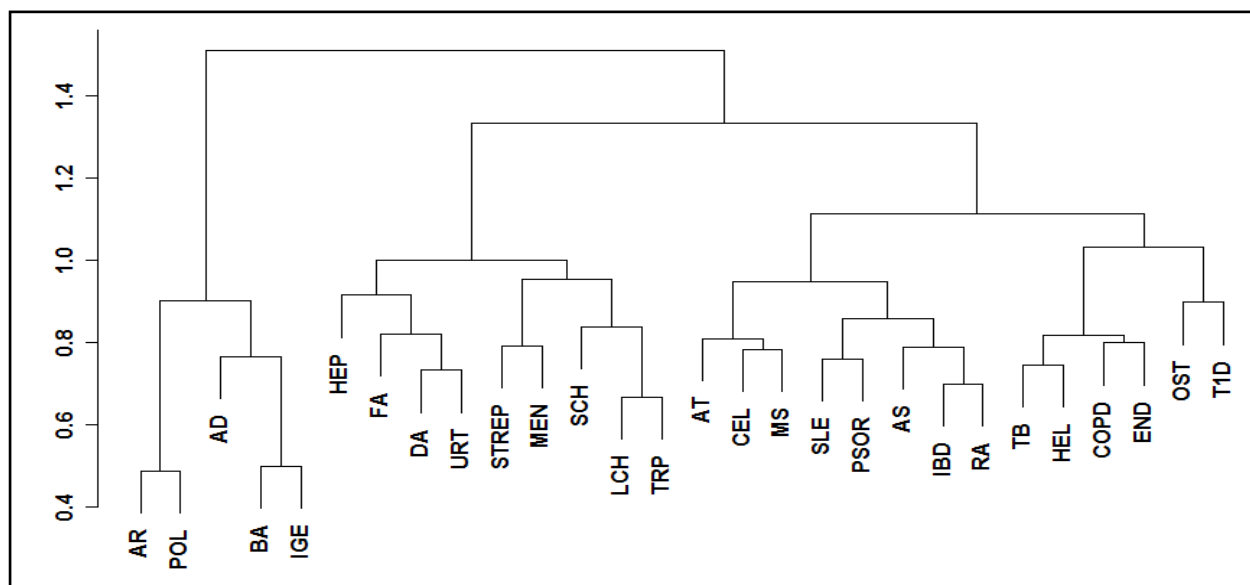


Рис. 2 – Кластеры многофакторных болезней по общности ассоциированных с ними генов. Обозначения: T1D – сахарный диабет I типа, AR – аллергический ринит, POL – поллиноз, AD – атопический дерматит, BA – бронхиальная астма, IgE – уровень иммуноглобулина-Е, AT – аутоиммунный тиреоидит, CEL – целиакия, MS – рассеянный склероз, SLE – системная красная волчанка, PSOR – псориаз, AS – анкилоизирующий спондилит, IBD – воспалительное заболевание кишечника, RA – ревматоидный артрит, OST – остеопороз, TB – туберкулез, HEL – хеликобактерная инфекция, COPD – хроническая обструктивная болезнь легких, END – эндометриоз, HEP – вирусный гепатит, FA – пищевая аллергия, DA – лекарственная аллергия, URT – крапивница, STREP – стрептококковая инфекция, MEN – менингококковая инфекция, SCH – шистосомоз, LCH – лейшманиоз, TRP – трипаносомоз.

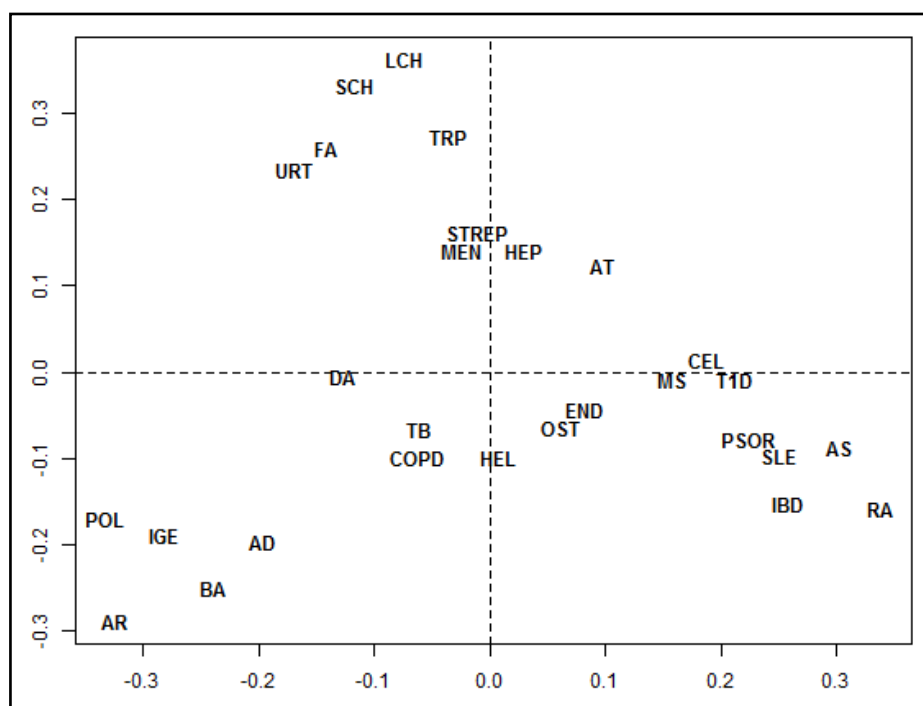


Рис. 3 – Многомерное шкалирование многофакторных заболеваний на основании общности ассоциированных с ними генов.

Специфические гены аллергических заболеваний. Специфическая привязка аллергических реакций к определенному органу или ткани обозначена понятием «шокового органа» (Bendkowski, 1965). Шоковый орган определяется путем поступления антигенов в организм, а также фиксацией специфических антител в определенных участках ткани или органа. Предположительно, локализация аллергического процесса в определенном тканевом окружении накладывает отпечаток на особенности патогенеза разных АЗ. Следствием этого является наличие специфических генов, изменчивость которых вносит существенный вклад в развитие только определенных АЗ. В проведенном исследовании специфическими считали гены АЗ, связанные, по данным NuGe Navigator, только с одним из исследованных фенотипов. Для БА известен 31 специфический ген, для АД – 57, для АР и поллиноза – 50, для ЛА – 34, для ПА и крапивницы – 3 и 5 соответственно, и для уровня IgE – 11.

Для обобщенной характеристики специфических генов АЗ использовали анализ генных онтологий (ГО), а также поиск функциональных кластеров генов. Статистически значимые ГО получены для БА, АД и лекарственной аллергии. Согласно полученным данным, специфические гены БА характеризуют мышечное сокращения и ответ на повреждения (GO:0006937~регуляция мышечного сокращения; GO:0009611~ответ на повреждение). В первом случае речь идет о регуляции гладкомышечной активности бронхов, связанной, в частности, с активностью генов холинэргических рецепторов *CHRM2* и *CHRM3*. Холинэргические парасимпатические нервные волокна являются доминирующим компонентом иннервации бронхолегочной системы человека. Ацетилхолин посредством стимуляции М3-холинорецепторов вызывает бронхоспазм, гиперсекрецию слизи и вазодилатацию (Belmonte, 2005). Нами ранее установлена повышенная экспрессия гена *CHRM3* у больных БА по сравнению с ХОБЛ, а также у больных ХОБЛ с бронхиальной гиперреактивностью по сравнению с больными ХОБЛ без таковой (Selivanova et al., 2012). То есть, изменчивость генов холинэргической регуляции сокращения гладких мышц бронхолегочной системы является одним из заметных факторов предрасположенности бронхиальной гиперреактивности, специфическому симптому БА.

ГО для специфических генов АД характеризуют процессы развития покровных тканей, и противомикробного иммунитета (GO:0031424 ~ кератинизация; GO:0008544 ~ развитие эпидермиса; GO:0006952 ~ защитный

ответ). Генетические исследования АД установили важную роль хромосомного региона 1q21, где расположены гены комплекса эпидермальной дифференцировки (Cookson W.O., 2004), многие из которых усиленно экспрессируются в коже пациентов с АД и псориазом (Bowcock et al., 2001; Zhou et al., 2003). Они относятся к нескольким семействам: малые протеины с пролин-богатым регионом (small proline-rich region proteins), S100A кальций-связывающие протеины (S100A calcium-binding proteins) и белки поздних покровов (late envelope proteins).

Специфические гены ЛА в основном связаны с активностью аденилил циклазы (гены *ADORA*) и реакциями биотрансформации, опосредованными цитохромами P-450 (*CYP*) (GO:0045028~активность пуринаргических рецепторов; GO:0010033~ответ на органические субстанции).

Результаты анализа ГО для специфических генов БА, АД и ЛА подтверждают данные о функциональной кластеризации генов. Этот метод основан на выборе группы генов, объединенные общей функциональной активностью. Для БА и ЛА выделено по одному кластеру, включающему гены холинэргических рецепторов и белки семейства цитохрома P450 соответственно. Для АР и поллиноза найдено два кластера, включающие цитокины, хемокины и факторы роста. Для АД идентифицировано четыре кластера, включающие белки семейства S100, белки поздних покровов, малые белки, богатые пролином, цитокины и факторы роста.

В целом проведенный анализ позволил установить общие и специфические гены АЗ, охарактеризовать сферу их компетенции, определить молекулярные взаимоотношения между болезнями этой группы, а также оценить положение АЗ в системе многофакторных заболеваний.

ГЛАВА 2. ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ БОЛЕЗНЕЙ И ПРИЗНАКОВ

Полногеномный анализ ассоциаций (ПГАА) является стандартным методом изучения наследственных основ МФЗ человека. Это связано с удешевлением эффективных технологий масштабного генотипирования и с высокой продуктивностью ПГАА в выявлении малых фенотипических эффектов генов с величиной отношения шансов менее 1,5 (Pearson, Manolio, 2008). Нами впервые проведен ПГАА для АЗ в российской популяции. Исследование выполнено в рамках международного проекта GABRIEL, финансируемого 6-й Рамочной

программой Европейского Сообщества. Это исследование, включившее около 40 партнеров из стран Восточной и Западной Европы, Азии, США и Канады, направлено на установление генетических и внешнесредовых причин распространения астмы в Европе (www.gabriel-fp6.org).

2.1. Материал и методы

Характеристика обследованных групп. Обследованная семейная выборка сформирована в 1998-2007 г.г. на базе клинических учреждений г. Томска (150 семей) и г. Иркутска (46 семей); всего – 804 человека. Семьи зарегистрированы по пробандам – детям, больным БА. Для всех членов семей проведена клиническая и лабораторная диагностика для постановки диагноза БА и других АЗ на основе критериев международной инициативы The Global Initiative for Asthma (GINA, 2011). Средний возраст больных БА с возрастом начала до 16 лет составил $13,7 \pm 9,9$ лет (82 девочки, 143 мальчика); средний возраст больных БА с более поздним возрастом начала – $38,8 \pm 9,4$ лет (45 женщин, 18 мужчин). У 194 человек установлено сочетание БА с АД и/или АР. АЗ, определяемые как наличие любого из таких заболеваний, как БА, АР, АД, крапивница, поллиноз, ПА и ЛА, установлены у 397 человек. Атопическая сенсibilизация по данным кожного аллерготестирования диагностирована у 194 человек.

Для валидации результатов ПГАА дополнительно проанализированы две выборки. Первая сформирована сотрудниками лечебно-профилактических учреждений г. Курска в 2003-2004 г.г. и включала 279 здоровых человек (138 мужчин, 141 женщина, средний возраст $41,3 \pm 10,2$ лет) и 295 больных БА (146 мужчин, 149 женщин, средний возраст $43,3 \pm 11,4$), включая 117 пациентов с детской астмой. Все индивиды – русские и неродственные между собой. Диагноз астмы поставлен на основании характерных клинических симптомов, обратимости обструкции дыхательных путей или наличия бронхиальной гиперреактивности в тесте с метахолином ($PC20 < 8$ мг/мл). Критериями включения в группу здоровых индивидов были: отсутствие симптомов и истории аллергических и других хронических заболеваний, уровень общего сывороточного IgE менее 100 U, параметры функции внешнего дыхания в пределах нормальных значений. Генотипирование этой выборки осуществлено в рамках проекта GABRIEL. Данные генотипирования и информация о диагнозах

предоставлены профессором Курского медицинского университета А.В. Полониковым.

Другая выборка представлена жителями г. Томска и Томской области и сформирована для изучения генно-средовых взаимодействий в развитии аллергий (см. раздел 3).

Для всех участников получено подписанное информированное согласие. Протокол исследования утвержден Этическими комитетами Сибирского государственного медицинского университета, ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН и Курского государственного медицинского университета (для курской выборки).

Молекулярно-генетический анализ. Для генетического анализа у всех обследованных индивидов была взята периферическая кровь и выделена ДНК с использованием стандартных методик. Для генотипирования использован микрочип Illumina 610-Quad BeadChip, включающий более 600 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП). Генотипирование выполнено в Национальном Центре Генотипирования Франции в Эври (Centre National de Génotypage, Evry). По результатам генотипирования проведен анализ родственности между обследованными индивидами, позволивший выявить несколько случаев ложного отцовства и дубликатов семей. Финальная выборка состояла из 686 человек. Из исследования исключены маркеры с частотой редкого аллеля менее 3% и маркеры с отклонением от равновесия Харди-Вайнберга у здоровых неродственных лиц с уровнем значимости менее 0,0001 (тест χ^2 с одной степенью свободы). В итоге проанализированы 538563 ОНП маркера.

Для валидации ассоциации гена *KCNE4* с аллергическим ринитом проведено генотипирование полиморфизма rs12621643 (c.435T>G; p.Asp145Glu) с помощью рестрикционного анализа.

Статистический анализ. Для анализа ассоциации маркеров с заболеваниями и признаками использовали семейный тест Transmission/Disequilibrium Test. Расчеты проводили с помощью программы PLINK v.1.07 (Purcell et al., 2007). Геномный уровень значимости ассоциации принят равным $P < 5 \times 10^{-7}$. Оценку ассоциации в рамках валидации результатов ПГАА проводили с помощью лог-регрессионного анализа с использованием пакета *SNPassoc* (González et al., 2007). Коррекцию на множественные сравнения проводили с помощью процедуры False Discovery Rate (FDR) (Benjamini,

Hochberg, 1995). Также проведен сравнительный анализ частот гаплотипов у больных и здоровых лиц с помощью пакета *haplo.ccs* (French et al., 2006). Статистически значимыми считали различия для $p < 0,05$ после коррекции на множественные сравнения.

2.2. Результаты и обсуждение

Новые гены-кандидаты детской бронхиальной астмы и аллергического ринита. Установлена ассоциация детской БА (с возрастом начала до 16 лет) с тремя ОНП: rs2425656 (хромосома 20q13.12, рядом с геном *YWHAB*, $p = 1,99 \times 10^{-7}$), rs3817222, rs12734001 (хромосома 1q32.1, рядом с геном *PPP1R12B*, $p = 2,18 \times 10^{-7}$ и $2,79 \times 10^{-7}$ соответственно) (рис. 4А), и АР – с одним маркером: rs1597167 (хромосома 2q36.1, рядом с геном *KCNE4*, $p = 3,69 \times 10^{-7}$) (рис. 4Б). Ассоциация региона 20q13.12 с БА показана впервые, однако ранее установлено сцепление БА и ряда родственных фенотипов с локусом в участке 20q13.33, расположенного примерно на 16 Мб ближе к теломере (Ferreira et al., 2005). Ген *YWHAB*, ассоциированный с детской БА, кодирует β -изоформу активаторного протеина, относящегося к семейству белков 14-3-3, которые задействованы в сигнальных путях с участием протеин киназы С, уровень которой повышается в ответ на провоспалительные стимулы, что способствует повышению тонуса гладкомышечных клеток дыхательных путей, более выраженному у больных БА (Cheng et al., 2007). Уровень протеин киназы С повышается в лимфоцитах больных БА по сравнению со здоровыми лицами; кроме того, установлена отрицательная корреляция между уровнем протеин киназы С и ОФВ1 (Bansal et al., 1997). Таким образом, ген *YWHAB* может быть ассоциирован с БА опосредованно через регуляцию активности протеин киназы С и является связующим звеном между воспалением и тонусом гладкомышечных клеток дыхательных путей.

ОНП на хромосоме 1q32.1, ассоциированные с БА, находятся в полном неравновесии по сцеплению ($D' = 1$). Для этого региона недавно в полногеномном исследовании установлена ассоциация с БА, бронхиальной гиперреактивностью, параметрами легочной функции и уровнем белка YKL-40 (Ober et al., 2008). Ассоциированный маркер расположен в промоторе гена *CHI3L1*, который находится на расстоянии примерно в 803 Кб от гена *PPP1R12B*. Ни один из ОНП, ассоциированных с БА у жителей Западной Сибири, не был в сцеплен с ОНП,

маркирующими гаплотипы, связанные с БА в другой популяции. Поэтому можно полагать, что установленная ассоциация является независимой, а ген *PPP1R12B* – новый ген-кандидат детской БА. Ассоциация *PPP1R12B* с БА установлена также у пуэрториканцев (Gignoux et al., 2009), однако детали исследования не доступны, поэтому трудно судить, в какой степени эти данные соответствуют результатам нашего исследования. Белок, кодируемый геном *PPP1R12B*, участвует в регуляции тонуса поперечно-полосатых и сердечной мышц, а также может связываться с предшественником ИЛ-16 (Bannert et al., 2003), хемоаттрактанта лимфоцитов, уровень которого повышается в бронхоальвеолярном лаваже у больных БА и АР (Afifi et al., 2004).

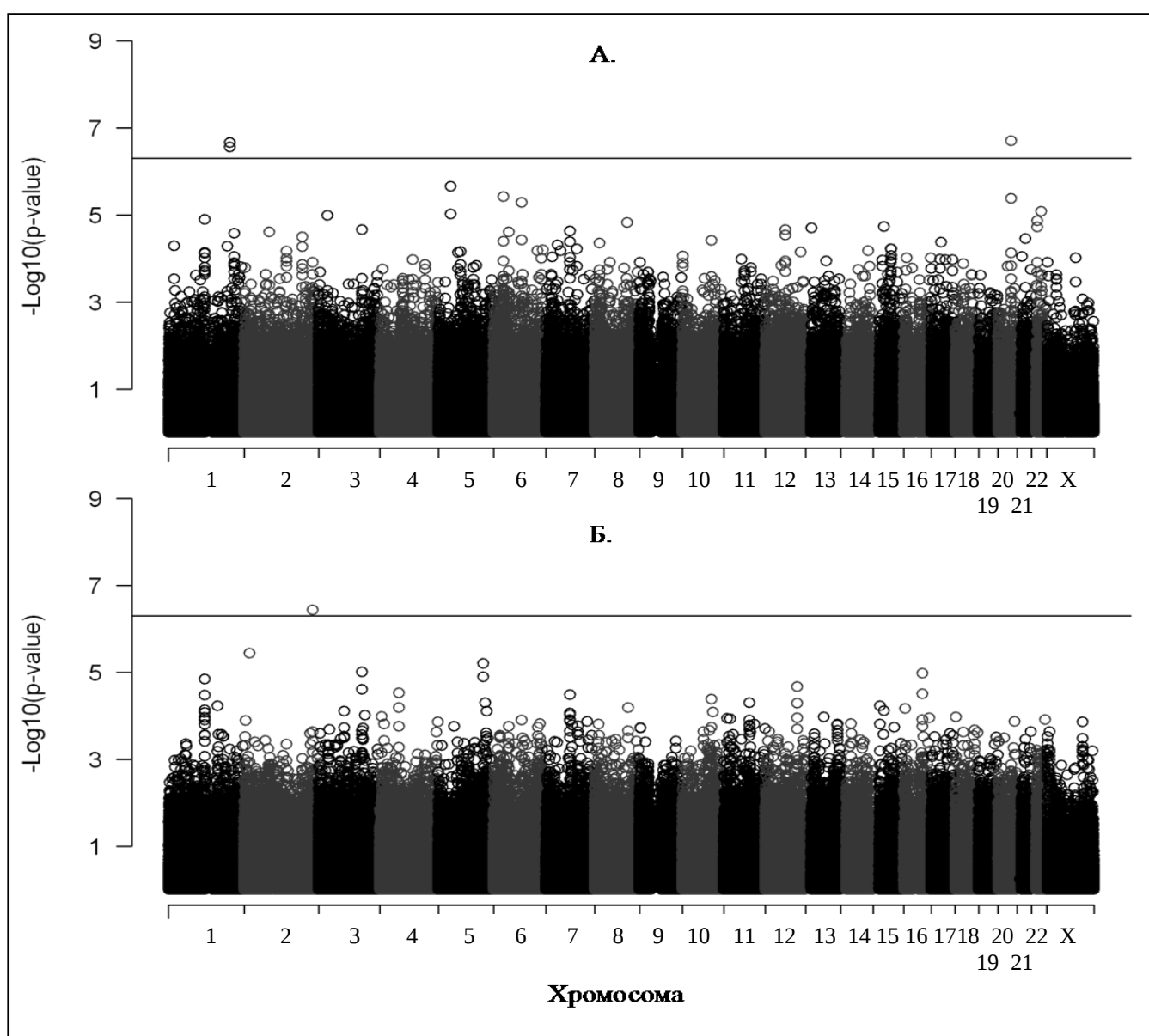


Рис. 4 – Графики Манхеттен для полногеномного анализа ассоциаций для детской бронхиальной астмы (А) и аллергического ринита (Б.). Горизонтальная линия соответствует принятому в исследовании геномному уровню значимости 5×10^{-7} .

Для региона 2q36, ассоциированного с АР у жителей Западной Сибири, в других популяциях показана связь с БА и ОФВ1 (Bouzigon et al., 2007; Choudhry et al., 2008). Кроме того, в регионе 2q33 расположен главный локус, контролирующий уровень эозинофилов (Evans et al., 2004).

Другие возможные ассоциации. Шестьдесят два ОНП продемонстрировали ассоциацию с исследованными болезнями или признаками на уровне значимости порядка $\times 10^{-6}$. Эти ассоциации не могут быть признаны статистически значимыми, однако ряд из них представляет интерес. Так, два сцепленных маркера (rs36019094 и rs34868670) проявили тенденцию к ассоциации с детской БА ($p = 2,21 \times 10^{-6}$ и $9,58 \times 10^{-6}$ соответственно). Они расположены в регионе 5p13.1, для которого установлено сцепление с БА и бронхиальной гиперреактивностью у гаттеритов и немцев (Kurz et al., 2006). С АР связан ОНП rs4705227, расположенный вблизи гена *SPINK5* ($p = 6,21 \times 10^{-6}$), для которого показаны воспроизводимые ассоциации с АЗ (Kato et al., 2003; Nishio et al., 2003). ОНП, маркирующие гены *ACPL2* (3q23), *BAT1* (6p21.33), *MAGI2* (7q21.11), проявили тенденцию к ассоциации с несколькими фенотипами: детской БА, АР, атопической сенсibilизацией и АЗ. Возможно, эти три гена являются общими для АЗ вообще, или, по нашей терминологии, – синтропными генами (Пузырев, Фрейдин, 2009; Фрейдин, Пузырев, 2010). Патологическая роль гена *ACPL2* не установлена, однако гены *BAT1* и *MAGI2* связаны с рядом иммуннозависимых и воспалительных заболеваний (Quiñones-Lombraña et al., 2008; McGovern et al., 2009). ОНП, расположенные вблизи генов *RIT2* и *FSTL4*, проявили тенденцию к ассоциации с признаками ФВД. Ген *RIT2* кодирует кальмодулин-связывающий G-белок, который может играть существенную роль в кальций-зависимой регуляции мышечных сокращений бронхов. Ген *FSTL4* кодирует фоллистатин-подобный белок; его полиморфизмы ассоциированы с риском сердечно-сосудистых заболеваний (Shiffman et al., 2008; Luke et al., 2008). Ни один из этих генов ранее не исследован в отношении связи с АЗ и ФВД, однако ген *FSTL4* расположен в регионе 5q31, для которого показано сцепление с БА, бронхиальной гиперреактивностью, атопией и признаками ФВД (Aschard et al., 2009). Три сцепленных ОНП в регионе 1q41 вблизи гена *GPATCH2* проявили тенденцию к ассоциации с БА с возрастом начала после 16 лет. Ни для этого региона, ни для гена *GPATCH2* ранее не показана ассоциация с БА или АЗ. Однако другой локус, 2p16.1, возможно, ассоциированный со взрослой БА, как

установлено в нескольких исследованиях, связан с БА, бронхиальной гиперреактивностью и уровнем IgE (Wjst et al., 1999; Immervoll et al., 2001; Pillai et al., 2006). Нужно отметить, что локусы взрослой и детской БА не перекрываются, свидетельствуя, что это, возможно, два генетически разных заболевания.

Таким образом, ПГАА, впервые проведенный для АЗ у русских жителей Западной Сибири, позволил выявить новые гены-кандидаты подверженности детской БА, АЗ, АР и атопической сенсibilизации (*YWHAB*, *PPP1R12B*, *KCNE4*, *BAT1*, *MAGI2*, *ACPL2*). Также, гены *RIT2* и *FSTL4* могут представлять интерес в качестве факторов, участвующих в формировании особенностей ФВД.

Валидация результатов полногеномного анализа ассоциаций. Воспроизведение результатов ПГАА в независимых популяциях является важнейшим этапом генетического анализа МФЗ (Akhabir, Sandford, 2011). Для подтверждения результатов проведенного нами ПГАА использованы результаты генотипирования в рамках проекта GABRIEL выборок больных БА из здоровых лиц из г. Курска. Анализ проведен для генов *YWHAB*, *PPP1R12B* и *GPATCH2*. Для анализа были выбраны 15 ОНП гена *YWHAB*, 26 ОНП гена *PPP1R12B* и 112 ОНП для гена *GPATCH2*. Для оценки ассоциации провели сравнение частот аллелей у здоровых лиц с больными детской и взрослой БА по отдельности и совместно.

Для генов *YWHAB* и *GPATCH2* ассоциации с БА не обнаружено, в то же время четыре ОНП гена *PPP1R12B* оказались связаны с детской, но не взрослой БА или БА без уточнения возраста начала. Для всех четырех ОНП редкий аллель связан с повышенным риском детской БА (табл. 4). Два ОНП (rs3817222 и rs12734001) ассоциированы с детской БА и в томской выборке, что подтверждает значимость *PPP1R12B* в развитии детской, но не взрослой БА.

Таблица 4 – Частоты аллелей и величины отношения шансов (ОШ) для ОНП гена *PPP1R12B*, ассоциированных с детской БА в курской популяции.

ОНП	Доля редкого аллеля (больные БА / здоровые)	ОШ (95% ДИ)	p*
rs17438212; c.291+13240T>G	G: 0,206 / 0,130	1,7 (1,1-2,6)	0,031
rs12734001; c.423-834C>T	T: 0,329 / 0,243	1,5 (1,1-2,1)	0,029
rs3767423; c.1668-554A>G	G: 0,193 / 0,123	1,7 (1,1-2,6)	0,031
rs3817222; c.2398C>T (p.Arg800Trp)	T: 0,324 / 0,243	1,5 (1,1-2,1)	0,029

Примечание. * – оценка статистической значимости различий частот аллелей, скорректированная на множественные сравнения

В контрольной группе четыре ОНП, ассоциированные с детской БА, образуют два независимых блока гапетического неравновесия (рис. 5А). Однако в группе с детской БА все четыре маркера находятся в сильном неравновесии по сцеплению (рис. 5Б). Таким образом, можно предполагать важность гаплотипической структуры *PPP1R12B* в развитии детской БА. Для проверки этого предположения проведен анализ частот гаплотипов для четырех полиморфизмов гена *PPP1R12B*, связанных с астмой, у больных детской БА и здоровых лиц. Выявлены три распространенных гаплотипа с частотой не менее 5% у больных и в контроле. Наиболее частый гаплотип, представленный сочетанием распространенных аллелей Т-С-А-С, был протективным в отношении развития детской БА ($ОШ=0,240$; $p=4,1 \times 10^{-12}$). Два других гаплотипа, G-C-G-C и T-T-A-T, ассоциированы с повышенным риском развития заболевания ($ОШ=1,835$; $p=0,017$; $ОШ=1,947$; $p=0,006$ соответственно). Гаплотип, представленный распространенными аллелями, является протективным в отношении развития БА, тогда как любая комбинация двух редких и двух частых аллелей повышает риск заболевания. Это предполагает, что два выявленных гаплотипических блока являются независимыми факторами риска детской БА.

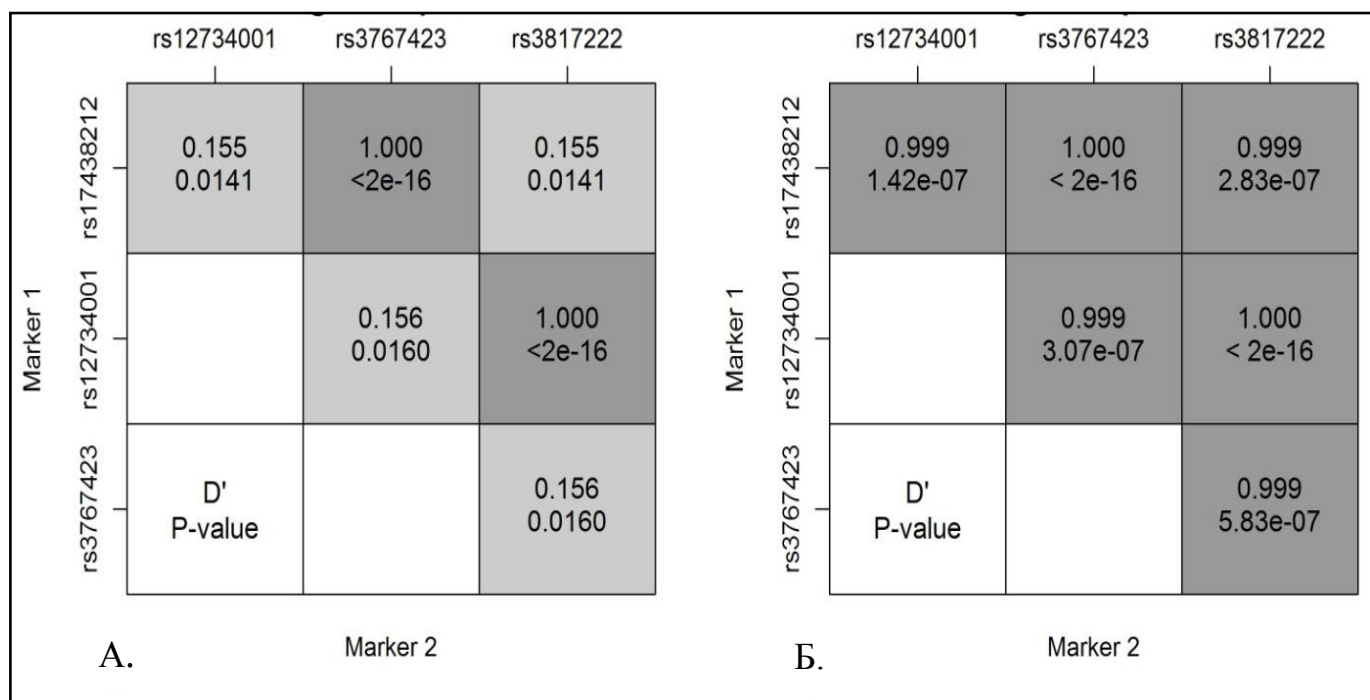


Рис. 5 – Паттерны неравновесия по сцеплению между ОНП гена *PPP1R12B*, ассоциированными с детской БА в курской популяции: А – в контрольной группе, Б – у больных детской БА. Обозначение: D' – стандартизованная мера неравновесия по сцеплению Левонтина; P-value – оценка статистической значимости неравновесия по сцеплению.

Для валидации связи гена *KCNE4* с АР выбран полиморфизм rs12621643, ассоциированный с острой лимфобластоидной лейкемией (Treviño et al., 2009). Для подтверждения результатов полногеномного исследования, проведено генотипирование этого полиморфизма с АР, протекающим самостоятельно или на фоне БА, а также у здоровых в отношении АР лиц. Первоначально установлена ассоциация аллелей исследуемого варианта с АР без учета наличия БА ($p=0,034$; для аллеля *KCNE4**G: ОШ=1,54; 95% ДИ=1,03-2,27). При включении в модель БА в качестве ковариаты ассоциация теряет статистическую значимость ($p = 0,210$), свидетельствуя о возможном влиянии коморбидности с БА на связь между rs12621643 и АР. Этот эффект подтвержден путем построения модели взаимодействия двух факторов – БА и rs12621643 ($p_{\text{int}}=0,023$). Суть эффекта заключается в том, что статистически значимая связь варианта rs12621643 с АР (повышенная частота аллеля *KCNE4**G и генотипа *KCNE4**G/G) имеет место только у лиц, не страдающих БА, в то время как у больных БА, частоты аллелей и генотипов у лиц с АР и без АР не различаются. Частоты генотипов Т/G и Т/Т у больных АР, но не БА, ниже, чем у лиц без АР, свидетельствуя о рецессивном эффекте аллеля *KCNE4**G в отношении манифестации ринита (для аллеля *KCNE4**G: ОШ=4,90; 95%ДИ=1,17-43,7; для генотипа *KCNE4**G/G: ОШ=5,84; 95%ДИ=1,19-56,30). Таким образом, полученные данные подтверждают установленную в полногеномном исследовании связь гена *KCNE4* с АР, а также свидетельствуют о том, что коморбидность АР и БА, возможно, нивелирует эту ассоциацию.

ГЛАВА 3. ГЕННО-СРЕДОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РАЗВИТИИ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В проведенном исследовании роли генно-средовых взаимодействий в развитии аллергии в качестве фактора внешней среды выбрана гельминтная инвазия *Opisthorchis felinus*. Важности этой инвазии в отношении развития аллергических болезней установлена в эпидемиологических и клинических исследованиях у жителей Томской области, которые показали пониженную частоту БА и АД в регионах с высокой частотой описторхоза, более легкое течение обоих заболеваний на фоне описторхозной инвазии и ухудшение их симптоматики после дегельминтизации (Елисеева О.В., 2009; Гонсорунова Д.С., 2011). В качестве генетических факторов выбраны однонуклеотидные

полиморфизмы генов цитокиновых лигандов и рецепторов и внутриклеточных сигнальных молекул, участвующих в контроле баланса между клеточным (Th1) и гуморальным (Th2) иммунитетом: *IFNGR2* (rs17880053), *TBX21* (rs11652969), *STAT5B* (rs16967593), *IL4RA* (rs1805010), *IFNG* (rs2069705), *PIAS4* (rs3760903), *SOCS5* (rs6737848), *IL4* (rs2070874), *GATA3* (rs10905277), *PIAS3* (rs12756687).

3.1. Материал и методы

Характеристика обследованных групп. Материал для исследования больных БА, описторхозом и их сочетанием собран на базе клинических учреждений г. Томска. Для исследования были сформированы четыре группы: больные БА (107 человек; 28 мужчин, 79 женщин; средний возраст $40,6 \pm 12,9$ лет); больные описторхозом (110 индивидов; 27 мужчин, 83 женщины; средний возраст $37,2 \pm 13,1$ лет); больные БА на фоне описторхоза составили 100 человек (16 мужчин, 84 женщины; средний возраст $44,3 \pm 12,7$ лет); здоровые индивиды (125 человек; 20 мужчин, 105 женщин; средний возраст $32,0 \pm 11,2$ лет). Для проведения иммунологического этапа исследования (анализ уровня производства цитокинов мононуклеарами периферической крови) проанализировано 40 человек: 10 здоровых индивидов (4 мальчика, 6 девочек; средний возраст $14,9 \pm 1,6$ лет); 10 больных БА (5 мальчиков и девочек; средний возраст $12,6 \pm 3,1$); 10 больных описторхозом (4 мальчика, 6 девочек; средний возраст $12,1 \pm 1,5$ лет); 10 больных БА на фоне описторхоза (6 мальчиков, 4 девочки; $11,8 \pm 3,0$ лет). Клинико-лабораторное исследование включало сбор анамнеза, физикальное обследование, кожные аллергопробы, паразитологическое обследование (копроовоскопия, дуоденальное зондирование), измерение уровня общего сывороточного IgE, спирометрию. Протокол исследования утвержден Этическими комитетами ФГБУ НИИ медицинской генетики СО РАМН и Сибирского государственного медицинского университета.

Иммунологические методы исследования. Исследование заключалось в оценке уровня цитокинов в краткосрочных культурах мононуклеаров периферической крови до и после антигенной индукции. Для этого проводили реакцию бластной трансформации лимфоцитов в следующих вариантах: спонтанная реакция; стимулирование секреторной способности лимфоцитов с помощью фитогемагглютинаина, антигена *O. felineus* и аллергена *D. pteronyssinus*. После стимуляции и инкубации клеточных культур при 37°C в течение 72 часов в

5% CO₂ в культуральной среде определяли уровни цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ТРФ- β с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

Молекулярно-генетические методы. Проанализированы 10 полиморфных вариантов генов *IL4*, *IL4RA*, *STAT5A*, *SOCS5*, *PIAS3*, *PIASY*, *TBX21*, *IFNG*, *IFNGR2*, *GATA3* (табл. 5). Для генотипирования индивидов по указанным полиморфным вариантам использовали ДНК, выделенную из венозной крови по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции. Генотипирование осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Таблица 5 – Перечень исследованных полиморфизмов

Ген	Полиморфизм	Локализация в гене	Изменение на уровне ДНК и белка
<i>PIAS3</i>	rs12756687	Интрон 1	с.25-477C>G
<i>PIAS4</i>	rs3760903	Интрон 1	с.28-1656A>G
<i>TBX21</i>	rs11652969	Интрон 1	с.492-2609G>A
<i>GATA3</i>	rs10905277	5'UTR	с.-251G>A
<i>IL4RA</i>	rs1805010	Экзон 3	с.223A>G; p.Ile75Val
<i>IL4</i>	rs2070874	Промотор	с.-33C>T
<i>STAT5B</i>	rs16967593	Интрон 1	с.-10-11390A>T
<i>IFNG</i>	rs2069705	Промотор	с.-126-1490C>T
<i>IFNGR2</i>	rs17880053	Промотор	с.-648-1705_-648-1704insG
<i>SOCS5</i>	rs6737848	Интрон 1	с.-13+1916C>G

Статистический анализ. Для сравнения средних значений количественных признаков использовали тесты Краскела-Уоллиса и Беренса-Фишера для независимых групп и тесты Фридмана и Немени-Дамико-Вольфа-Данна для зависимых групп с помощью пакетов *prtc* и *coin* для R (Helms, Munzel, 2008; Hothorn et al., 2008). Для определения межгрупповой вариабельности по исследуемым полиморфизмам использовали статистику Fst Райта с оценкой значимости гетерогенности с помощью модифицированного критерия χ^2 . Гаметическое неравновесие оценивали с помощью стандартизованной меры Левонтина D' (Хедрик, 2003). Сходство между группами по структуре гаметического неравновесия оценивали по корреляциям матриц Мантеля с помощью пакета *vegan* для R (Oksanen et al., 2011), используя матрицы D'. Для характеристики сходства между исследованными группами проводили кластерный анализ по методу Уорда и многомерное шкалирования (Сошникова и соавт., 1999). Для оценки ассоциации генетических маркеров с фенотипами

использовали логистическую и лог-линейную регрессию; при необходимости включали в модели ковариаты, такие как статус заболевания, возраст, пол. Для оценки эффекта генно-средовых взаимодействий строили регрессионную модель, включающую параметр взаимодействия между генным вариантом и фактом описторхозной инвазии. Тестировали следующие генотипические модели: кодоминантная, рецессивная и доминантная. Расчеты проводили с помощью пакета *SNPassoc* для R (González et al., 2007). Для тяжести течения БА расчеты проведены с помощью пакета *nnet* для R (Venables, Ripley, 2002). Коррекцию на множественные сравнения проводили с помощью процедуры FDR (Benjamini, Hochberg, 1995). Для оценки ассоциации фенотипов с комбинациями генотипических и средовых факторов использовали процедуру Model-Based-MDR (Calle et al., 2008). Статистическую значимость MDR-моделей оценивали с помощью пермутаций. Расчеты проводили с помощью пакета *mbmdr* для R (Calle et al., 2010). Диагностические и предиктивные возможности MDR-моделей оценивали путем расчета показателей чувствительности (SE), специфичности (SP) и величины AUC (площадь под ROC-кривой). Величину AUC интерпретировали в соответствии с принятыми рекомендациями: 0,5 – случайный классификатор; 0,5-0,6 – плохой классификатор; 0,6-0,7 – средний классификатор; 0,7-0,8 – хороший классификатор; >0,8 – отличный классификатор (Hosmer D.W., Lemeshow S. et al., 2000). Также расчет диагностического и предикторного потенциала MDR-моделей проводили с помощью процедуры перекрестной валидации, реализованной в пакете MDR для R (Winham, Motsinger-Reif, 2011).

3.2. Результаты и обсуждение

Оценка влияния описторхозной инвазии на иммунный ответ. Для оценки механизмов влияния *O. felineus* на иммунный ответ в норме и при аллергии проведен анализ уровней синтеза цитокинов ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10 и ТРФ- β в краткосрочных культурах клеток периферической крови у здоровых лиц и у больных атопической БА, описторхозом и их сочетанием. Во всех случаях, кроме стимуляции ФГА, минимальные уровни ИЛ-4 отмечены у больных БА на фоне описторхоза (0,9-1,2 пг/мл), при этом отличия статистически значимы. Пониженные величины уровня ИЛ-4 именно в группе с сочетанием БА и описторхоза свидетельствуют о важной модифицирующей роли ко-морбидности с описторхозом в отношении формирования особенностей иммунного ответа при

сопутствующем аллергическом заболевании. Минимальные уровни ИЛ-5 обнаружены у больных описторхозом для всех вариантов стимуляции ($0,00 \pm 0,75$ пг/мл), кроме ФГА (15,8 пг/мл). Статистически значимые различия уровней ИЛ-5 найдены у здоровых и больных БА в отсутствие стимуляции и при стимуляции антигеном *D. pteronissinus* у здоровых и больных БА, с одной стороны, и у больных описторхозом, с другой. То есть, описторхозная инвазия сопряжена с низким уровнем ИЛ-5, однако на фоне БА этот эффект снижается. Наибольшие уровни ИЛ-10 отмечены в группе больных БА на фоне описторхоза для всех вариантов антигенной стимуляции (до 500 пг/мл). По сравнению с больными БА, лица с описторхозом демонстрируют существенно более высокий уровень ИЛ-10 при всех вариантах антигенной стимуляции. Минимальные уровни ТРФ- β установлены у больных БА на фоне описторхоза (27,0-27,8 пг/мл), при этом статистически значимые отличия этой группы от других отмечены при стимуляции антигенами *O. felineus* и *D. pteronissinus*.

Таким образом, установлено наличие существенных отличий уровня продукции цитокинов периферическими мононуклеарами больных БА на фоне описторхоза от остальных групп. Группа сочетанной патологии отличается пониженным уровнем ИЛ-4 и ТРФ- β , а также повышенным уровнем ИЛ-10. ИЛ-4 является основным активатором Th2-иммунного ответа, развивающегося как при аллергии, так и при глистной инвазии. В целом результаты этого этапа исследования свидетельствуют о том, что инвазия *O. felineus* может оказывать значительное влияние на течение аллергических заболеваний за счет модификации иммунного ответа и иммунорегуляции.

Характеристика больных бронхиальной астмой, описторхозом и их сочетанием по полиморфизму генов-модификаторов иммунного ответа. Для исследования роли генно-средовых взаимодействий в развитии аллергических болезней сформированы четыре группы, дифференцированные по наличию атопической БА и описторхоза: здоровые лица, больные БА, больные описторхозом, а также больные БА и описторхозом одновременно. Межгрупповая вариабельность, оцененная с помощью статистики Fst, оказалась невысока; наибольшие величины получены для полиморфизмов генов *PIAS3* и *SOCS5* (0,007 и 0,015 соответственно), при этом только в последнем случае оценка Fst является статистически значимой ($p=0,007$). Кластерный анализ и многомерное шкалирование по данным о частотах аллелей в исследованных группах показали,

что наиболее близкими друг другу являются группы БА и БА_Опи, и контрольная группа наиболее удалена от трех групп больных (рис. 6).

В большинстве случаев между изученными генными вариантами отмечено статистически значимое гаметическое неравновесие. Отличия паттернов гаметического неравновесия связаны в основном с генами *STAT5B* и *PIAS3*. Наиболее слабые корреляции Мантеля по паттернам гаметического неравновесия установлены для здоровых лиц по отношению к другим исследованным группам; наиболее сильные – отмечены для больных описторхозом и БА (табл. 6).

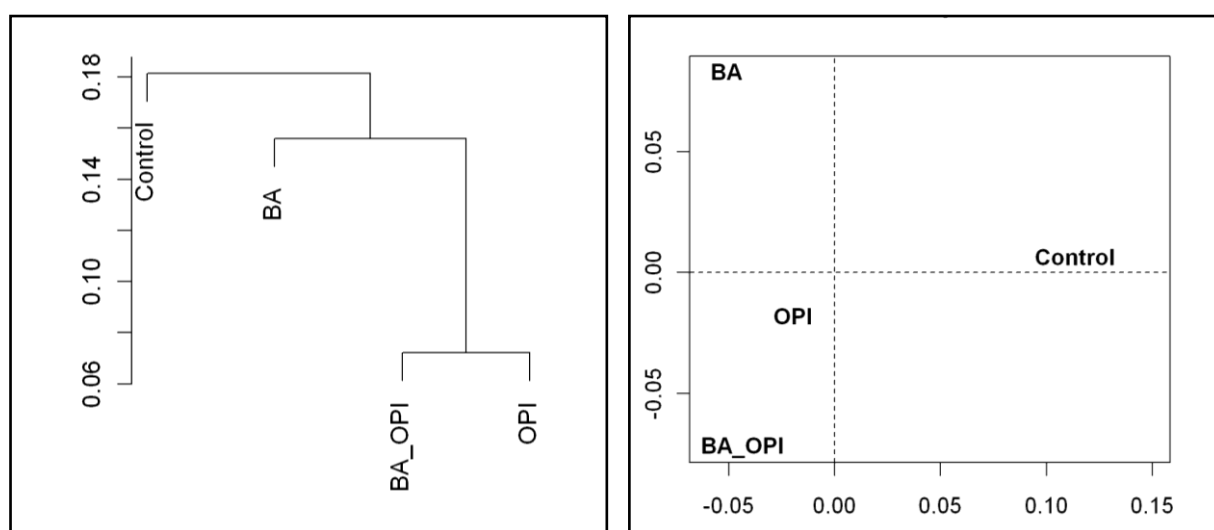


Рис. 6. Кластерная дендрограмма (слева) и результаты многомерного шкалирования для больных бронхиальной астмой (БА), описторхозом (ОПИ), обоими заболеваниями одновременно (БА_ОПИ) и здоровых лиц (Control) по данным о частотах аллелей генов-модификаторов иммунного ответа.

Таблица 6 – Корреляции Мантеля для матриц гаметического неравновесия

Группы	Бронхиальная астма	Бронхиальная астма на фоне описторхоза	Описторхоз	Здоровые лица
Бронхиальная астма	–	0,733	0,821	0,606
Бронхиальная астма на фоне описторхоза	0,001	–	0,808	0,609
Описторхоз	0,001	0,001	–	0,593
Здоровые лица	0,003	0,005	0,005	–

Примечание. Над центральной диагональю представлены коэффициенты корреляции Мантеля; под центральной диагональю – уровни значимости.

Полученные данные характеризуют исследованные группы больных и здоровых лиц по полиморфизму генов-модификаторов иммунного ответа и дают основания полагать, что они могут иметь патогенетическую значимость. Очевидно, что группа здоровых лиц заметно отличается от больных как изолированными заболеваниями, так и их сочетанием.

Анализ ассоциации генетических полиморфизмов с аллергическими заболеваниями и признаками с учетом описторхозной инвазии. Для оценки влияния взаимодействия описторхозной инвазии и полиморфизмов генов-модификаторов иммунного ответа проведены расчеты регрессионных моделей без включения описторхоза и с включением описторхоза в модель в качестве фактора взаимодействия. Установлены статистически значимые ассоциации ряда исследованных генов с БА, АД, АР, кожными аллергопробами, поливалентной сенсibilизацией и тяжестью течения БА (табл. 7). Полиморфизм гена *IFNG* связан с наибольшим количеством фенотипов (БА, АД, поливалентная сенсibilизация, тяжесть течения БА). Полиморфизмы генов *IFNGR2*, *STAT5B*, *TBX21*, *GATA3* и *IL4RA* проявили ассоциацию только с одним из исследованных фенотипов. Очевидно, что описторхозная инвазия является важным фактором, модифицирующим взаимоотношения между генотипом и фенотипом, так как в большинстве случаев, статистически значимая ассоциация имеет место при включении в модель параметра взаимодействия с описторхозом.

Межгенные взаимодействия как фактор риска аллергических заболеваний и признаков. С помощью метода MB-MDR проведен анализ межгенных и генно-средовых взаимодействий для аллергических фенотипов. Метод основан на выявлении комбинаций генотипов и факторов внешней среды, позитивно (высокий риск) или негативно (низкий риск) связанных с изучаемым фенотипом (Calle et al., 2010). Примеры полученных моделей приведены в таблице 8. Для БА установлена 21 статистически значимая двух-, трех- или четырехкомпонентная модель. Описторхозная инвазия входит в 8 моделей, причем в 7 случаях – в сочетании с геном *SOCS5*. В зависимости от сочетаний с генотипами, описторхоз входит в модели как высокого, так и низкого риска. Также, одни и те же генотипы могут входить в модели разной направленности, в зависимости от сочетания с другими генотипами, то есть, от генетического окружения. Значения AUC для всех моделей довольно низкие (0,53-0,61), свидетельствуя о невысоком диагностическом потенциале полученных моделей.

Таблица 7 – Статистически значимые регрессионные модели для ассоциации аллергических фенотипов с полиморфизмом генов-модификаторов иммунного ответа и описторхозом

Фенотип	Полиморфизм	Модель*	Уровень значимости
Бронхиальная астма	<i>PIAS3</i> / rs12756687	Кодоминантная	0,031
		Рецессивная	0,009
	<i>SOCS5</i> / rs6737848	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,004**
		Доминантная х <i>Орі</i>	0,001**
	<i>IFNG</i> / rs2069705	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,007**
		Рецессивная х <i>Орі</i>	0,016
Атопический дерматит	<i>GATA3</i> / rs10905277	Доминантная х <i>Орі</i>	0,045
	<i>IL4</i> / rs2070874	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,018
		Доминантная х <i>Орі</i>	0,008
	<i>IFNG</i> / rs2069705	Доминантная	0,047
Аллергический ринит	<i>TBX21</i> / rs11652969	Доминантная х <i>Орі</i>	0,042
	<i>SOCS5</i> / rs6737848	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,047
	<i>IL4</i> / rs2070874	Кодоминантная	0,033
		Рецессивная	0,022
Кожные аллергопробы	<i>STAT5B</i> / rs16967593	Кодоминантная	0,024
		Рецессивная	0,007
Поливалентная сенсibilизация	<i>IFNGR2</i> / rs17880053	Кодоминантная	0,045
		Доминантная	0,040
	<i>IFNG</i> / rs2069705	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,004**
		Доминантная х <i>Орі</i>	0,004**
		Рецессивная х <i>Орі</i>	0,011
	<i>IL4RA</i> / rs1805010	Рецессивная х <i>Орі</i>	0,028
Тяжесть течения бронхиальной астмы	<i>PIAS3</i> / rs12756687	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,012
	<i>IFNG</i> / rs2069705	Кодоминантная х <i>Орі</i>	0,042

Примечание. * – х *Орі* – модель, включающая эффект взаимодействия с описторхозной инвазией; ** – $p < 0,05$ после поправки на множественные сравнения

Для АД установлены всего три статистически значимые MDR-модели, причем наиболее ценной в диагностическом плане является трехкомпонентная модель, включающая описторхоз. Величина AUC для этой модели – 0,64, свидетельствуя о ее умеренной диагностической ценности. Для кожных аллергопроб выявлены 10 MDR-моделей. Описторхоз не входит ни в одну из них. Все выявленные сочетания являются протективными, при этом диагностическая ценность моделей низка (максимальное значение AUC – 0,58).

Таблица 8 – MDR-комбинации генотипов и фактора описторхозной инвазии, ассоциированные с аллергическими болезнями и признаками.

Модель	Предикторные сочетания		OR	SE	SP	AUC	P _{перм.}
	Сочетания	Риск					
Бронхиальная астма							
SOCS5 / IFNG / OPI	C/C-T/C-0 G/C-C/C-1 C/C-T/T-1	Высокий	2,55	0,48	0,73	0,61	0,002
IL4 / TBX21 / SOCS5	C/T-G/G-C/C C/T-G/A-C/C C/T-A/A-C/C C/C-G/A-G/C	Низкий	0,36	0,28	0,87	0,58	0,002
Атопический дерматит							
IL4 / STAT5B / OPI	C/C-T/T-0 T/T-T/T-1 C/T-A/A-1	Высокий	4,63	0,41	0,87	0,64	0,034
Кожные аллергопробы							
PIAS3 / IL4 / STAT5B	G/G-C/C-T/T C/C-C/C-T/T G/C-C/C-A/T	Низкий	0,47	0,40	0,76	0,58	0,008
Поливалентная сенсibilизация							
IFNG / OPI	C/C-0 T/C-0	Высокий	2,55	0,44	0,76	0,60	0,043
IL4RA / SOCS5 / OPI	Val/Val-C/C-0 Ile/Ile-C/C-1 Ile/Val-G/C-1	Низкий	0,31	0,39	0,84	0,61	0,044

Примечание. OPI – описторхозная инвазия (0 – нет, 1 – есть); OR – отношение шансов для указанной совокупности сочетаний; SE – чувствительность; SP – специфичность; AUC – показатель диагностической ценности модели; P_{перм.} – достигнутый уровень значимости модели, рассчитанный путем пермутаций.

Для поливалентной сенсibilизации установлены 7 статистически значимых MDR-моделей, включая одну модель повышенного риска. Все модели, кроме одной, включают описторхоз в сочетании с геном *IFNG*. Величины AUC для наиболее диагностически ценных моделей составляют 0,60 и 0,61, что свидетельствует об их умеренной способности к дискриминации лиц с поливалентной сенсibilизацией и без нее.

Для уровня общего IgE выявлены 19 статистически значимых MDR-моделей. Уровень дисперсии признака, объясненной ими, варьирует в пределах 15,4%-21,5%. Большая часть моделей включает описторхоз, однако он не входит в модель с наибольшим вкладом в дисперсию уровня IgE (21,5%): *GATA3* / *PIAS4* /

IL4RA. В большинстве случаев наличие описторхоза в модели связано с повышенным уровнем IgE у носителей определенных сочетаний, а его отсутствие – с пониженным уровнем IgE. Однако в ряде случаев, в зависимости от генетической композиции, вклад описторхозной инвазии может меняться.

Для степени тяжести БА найдены 18 статистически значимых MDR-моделей, в том числе 11 моделей с описторхозом. При этом в большинстве случаев присутствие описторхоза связано с риском более тяжелого течения БА. Поскольку степень тяжести БА имеет три градации, дополнительно к анализу MDR-моделей проведена оценка различий частот рискованных сочетаний между больными легкой, среднетяжелой и тяжелой БА. Различия между легкой и среднетяжелой БА, как правило, статистически не значимы, однако различия между среднетяжелой и тяжелой БА, в основном статистически значимы. То есть, легкая и среднетяжелая формы болезни, с точки зрения генетической и генно-средовой составляющей, ближе друг к другу, чем к тяжелой астме. Максимальные величины AUC для сравнения легкой и среднетяжелой БА с тяжелой формой болезни для моделей низкого риска (тенденция к более легкому течению БА у носителей сочетания) составили 0,66. Для моделей высокого риска AUC достигает 0,70-0,71. Это свидетельствует, что полученные модели могут быть эффективны с точки зрения диагностики степени тяжести БА. Наиболее эффективные в диагностическом плане модели включают описторхоз.

Для дополнительной проверки диагностической ценности MDR-моделей проведена процедура перекрестной валидации для наиболее перспективных моделей ($AUC \geq 0,60$ для БА, АД и поливалентной сенсibilизации и $AUC \geq 0,65$ для степени тяжести БА). Используемый подход позволяет оценивать как диагностическую значимость модели (точность классификации), так и предиктивную (точность предсказания). Согласно полученным данным, точность классификации для БА, АД и поливалентной сенсibilизации немногим превышает 60%, тогда как для тяжести течения БА точность классификации достигает 84%. Точность предсказания для всех фенотипов не превышает 70% (максимальное значение – 67% – получено для тяжести течения БА), и это означает, что полученные модели обладают умеренным предиктивным потенциалом.

Очевидно, что полученные MDR-модели могут служить ориентиром для выявления генов, взаимодействие которых с описторхозной инвазией

существенным образом связано с проявлением аллергии. Можно предположить, что это гены *SOCS5*, *IFNG* и *IFNGR2*, поскольку для них установлено наибольшее количество статистически значимых MDR-моделей с участием описторхоза (14, 13 и 12 соответственно). Молекула *SOCS5* взаимодействует с цитоплазматическим участком α -цепи рецептора ИЛ-4, кодируемого геном *IL4RA*, препятствуя развитию Th2-иммунного ответа (Seki Y. et al., 2002), а активация лигандом (ИФН- γ) рецептора, включающего продукт гена *IFNGR2*, стимулирует Th1-иммунитет. Таким образом, три наиболее существенных во взаимодействии с описторхозом генов вовлечены в общий путь поляризации иммунной системы в сторону Th1-профиля.

В целом результат проведенного исследования свидетельствуют о важной роли генно-средовых взаимодействий в развитии аллергии и характеризуют описторхоз как фактор, существенно модифицирующий фенотипический эффект полиморфизма генов, связанных с регуляцией иммунного ответа и баланса Th1/Th2-лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование имело целью охарактеризовать патогенетику аллергических болезней с позиции концепции синтропных генов, а также провести полногеномный анализ ассоциаций и оценить роль межгенных и генно-средовых взаимодействий в развитии заболеваний этой группы. Анализ данных о генах-кандидатах аллергических болезней, позволил установить синтропные и специфические гены БА, АД, АР, поллиноза, ПА и ЛА, крапивницы и уровня IgE. Показана подразделенность аллергических болезней на группы по степени общности генетической компоненты, совпадающая с представлениями о механизмах их патогенеза. Это дает основание полагать, что использованная методология может быть полезна для выявления закономерных групп многофакторных заболеваний в целом. Анализ, включающий болезни другой природы, показал общность генетической компоненты аллергических и инфекционных патологий и относительную удаленность аллергических и аутоиммунных заболеваний. Полногеномное ассоциативное исследование позволило открыть новые гены-кандидаты детской бронхиальной астмы (*PPP1R12B* и *YWHAB*) и аллергического ринита (*KCNE4*), а также несколько генов, представляющих интерес в плане дальнейших исследований в отношении

их значимости для аллергических болезней (*BAT1*, *MAGI2*, *ACPL2*) и параметров функции внешнего дыхания (*RIT2*, *FSTL4*). Впервые проанализирована гельминтная инвазия *O. felineus* в связи с ее вовлеченностью в систему генно-средовых взаимодействий в развитии аллергических болезней. Установлено, что *O. felineus* влияет на уровень цитокинов, регулирующих аллергическое воспаление. Доказано, что генно-средовые взаимодействия, учитывающие фактор описторхозной инвазии, связаны с аллергическими болезнями и признаками. Углубленный анализ межгенных и генно-средовых взаимодействий в развитии аллергических болезней с помощью подхода MB-MDR позволил установить комбинации генотипов и фактора описторхозной инвазии, ассоциированные с высоким и низким риском исследованных патологий. В ряде случаев эти модели обладают сравнительно высокой диагностической и предсказательной силой.

ВЫВОДЫ

1. С помощью биоинформационного ресурса HuGE Navigator установлены синтропные гены аллергических заболеваний (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит, пищевая и лекарственная аллергия, поллиноз, крапивница) и уровня IgE: *TNF*, *IL13*, *IL4*, *IL4R*, *TGFB1*, *MS4A2*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *CD14*, *LTC4S*, *IL10*, *TLR2*, *CTLA4*, *HLA-DQA1*. Эти гены вовлечены в регуляцию иммунного ответа в процессе аллергического воспаления и регуляцию противоинфекционного иммунитета.
2. По данным HuGE Navigator для бронхиальной астмы выявлен 31 специфический ген, для атопического дерматита – 57, для аллергического ринита и поллиноза – 50, для лекарственной аллергии – 34, для пищевой аллергии и крапивницы – 3 и 5 соответственно, и для уровня IgE – 11. С помощью анализа генных онтологий и анализа функциональных генных кластеров установлено, что специфические гены бронхиальной астмы вовлечены в регуляцию гладкомышечных сокращений и ответ на повреждения тканей; специфические гены атопического дерматита участвуют в процессах развития покровных тканей и противомикробного иммунитета; специфические гены аллергического ринита и поллиноза участвуют в регуляции сигнальной функции IgG, гомеостаза кальция и развитии воспаления; специфические генов лекарственной аллергии вовлечены в реакции биотрансформации ксенобиотиков.

3. С помощью кластерного анализа и многомерного шкалирования показано, что по данным об общности и специфичности генов исследованные аллергические фенотипы подразделены на две группы: первая включает уровень IgE, бронхиальную астму, атопический дерматит, аллергический ринит и поллиноз; вторая – крапивницу, пищевую и лекарственную аллергии. Первая группа разбивается на два подкластера: в один входят сезонные аллергические болезни – аллергический ринит и поллиноз, в другой – астма, атопический дерматит и уровень IgE. Кластеризация аллергических заболеваний совпадает с имеющимися представлениями об их этиологии и патогенезе, а также с принятой в клинической практике системе диагностики аллергий.
4. Установлены общие гены аллергий и других многофакторных заболеваний (*TNF*, *IL10*, *IL4*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DQA1*, *TGFB1*, *IL6*, *LTA*, *CTLA4*, *IL1RN*, *IL1B*, *ACE*, *HLA-B*, *MTHFR*, *TLR4*, *IFNG*, *IL1A*, *HLA-A*). Кластерный анализ и многомерное шкалирование, выполненные по данным об общности и специфичности генов многофакторных заболеваний, свидетельствуют о полярности на молекулярном уровне большинства аллергических и аутоиммунных болезней и о близости генетической компоненты аллергий к таковой для инфекций.
5. С помощью полногеномного анализа ассоциаций установлена связь детской бронхиальной астмы (с возрастом начала до 16 лет) с тремя маркерами: rs2425656 (хромосома 20q13.12, рядом с геном *YWHAB*, $p = 1,99 \times 10^{-7}$), rs3817222, rs12734001 (хромосома 1q32.1, рядом с геном *PPP1R12B*, $p = 2,18 \times 10^{-7}$ и $2,79 \times 10^{-7}$ соответственно), и аллергического ринита – с одним маркером: rs1597167 (хромосома 2q36.1, рядом с геном *KCNE4*, $p = 3,69 \times 10^{-7}$).
6. Выявлены 62 однонуклеотидных полиморфизма, связанные с исследованными аллергическими болезнями и признаками с уровнем значимости порядка $\times 10^{-6}$. Среди них два сцепленных маркера (rs36019094 и rs34868670) вблизи генов *LIFR* и *PTGE4* проявили тенденцию к ассоциации с детской астмой ($p = 2,2 \times 10^{-6}$ и $9,6 \times 10^{-6}$ соответственно). С аллергическим ринитом связан вариант rs4705227, расположенный вблизи гена *SPINK5* ($p = 6,2 \times 10^{-6}$). Полиморфизмы, маркирующие гены *ACPL2* (3q23), *BAT1* (6p21.33), *MAGI2* (7q21.11), проявили тенденцию к ассоциации с несколькими фенотипами: детской астмой, аллергическим ринитом, атопической сенсibilизацией и аллергическими заболеваниями в целом, что позволяет рассматривать их в качестве

синптропных генов аллергических болезней. Два полиморфизма (rs16942401, rs11635176), расположенные в регионе 15q22 проявили тенденцию к ассоциации с атопическим дерматитом. Полиморфизмы вблизи генов *RIT2* и *FSTL4* проявили тенденцию к ассоциации с признаками функции внешнего дыхания. Три сцепленных полиморфизма в регионе 1q41 вблизи гена *GPATCH2* (rs4846411, rs4846406, rs4146799) проявили тенденцию к ассоциации с бронхиальной астмой с возрастом начала после 16 лет.

7. Валидация результатов полногеномного исследования у жителей г. Курска не подтвердила связь астмы с генами *YWHAB* и *GPATCH2*. В то же время установлена статистически значимая ассоциация детской бронхиальной астмы с четырьмя однонуклеотидными полиморфизмами гена *PPP1R12B*: rs17438212 (отношение шансов (ОШ) = 1,746; 95% доверительный интервал (ДИ) = 1,164-2,618; $p = 0,031$), rs12734001 (ОШ = 1,530; ДИ = 1,091-2,145; $p = 0,029$), rs3767423 (ОШ = 1,709; ДИ = 1,128-2,589; $p = 0,031$) и rs3817222 (ОШ = 1,498, ДИ = 1,064-2,109, $p = 0,029$). Наиболее частый гаплотип *PPP1R12B*, представленный сочетанием распространенных аллелей Т-С-А-С, является протективным в отношении развития детской астмы (ОШ = 0,2395; $p = 4,14 \times 10^{-12}$). Два других гаплотипа, G-C-G-C и Т-Т-А-Т, ассоциированы с повышенным риском развития заболевания (ОШ=1,8350; $p=0,0168$; ОШ=1,9470; $p=0,0059$ соответственно).
8. Обследование жителей г. Томска и Томской области подтвердило ассоциацию гена *KCNE4* с аллергическим ринитом: установлена статистически значимая связь полиморфизма rs12621643 с заболеванием (ОШ = 1,54, ДИ = 1,03-2,27, $p = 0,034$). Показано также, что эта ассоциация модифицируется фактом кокорбидности ринита с бронхиальной астмой: статистически значимая связь варианта rs12621643 с ринитом имеет место только у лиц, не страдающих астмой (ОШ = 4,90, ДИ = 1,17-43,7, $p=0,019$), в то время как у больных астмой, частоты аллелей и генотипов у лиц с ринитом и без него не различаются.
9. Установлен существенный эффект гельминтной инвазии *Opisthorchis felinus* на модификацию иммунного ответа при атопической бронхиальной астме за счет снижения уровней интерлейкина-4 и трансформирующего ростового фактора- β и повышения уровня интерлейкина-10, продуцируемых лейкоцитами.

10. В рамках анализа генно-средовых взаимодействий в развитии аллергических симптомов у здоровых лиц, больных астмой, описторхозом и их сочетанием изучены 10 полиморфных вариантов генов-модификаторов иммунного ответа: *IFNGR2* (rs17880053), *TBX21* (rs11652969), *STAT5B* (rs16967593), *IL4RA* (rs1805010), *IFNG* (rs2069705), *PIAS4* (rs3760903), *SOCS5* (rs6737848), *IL4* (rs2070874), *GATA3* (rs10905277), *PIAS3* (rs12756687). Анализ частот аллелей и структуры гаметического неравновесия показал существенные отличия всех групп больных от здоровых лиц; наиболее выраженные отличия отмечены для генов *SOCS5*, *STAT5B* и *PIAS3*.
11. Установлены статистические значимые ассоциации ($p < 0,05$) полиморфизма *IFNG* с бронхиальной астмой, атопическим дерматитом, поливалентной сенсibilизацией и тяжестью течения астмы; *PIAS3* – с астмой и тяжестью ее течения; *SOCS5* – с астмой и аллергическим ринитом; *IL4* – с атопическим дерматитом и аллергическим ринитом; *GATA3* – с атопическим дерматитом; *TBX21* – с аллергическим ринитом; *STAT5B* – с положительными результатами кожных алергопроб; *IFNGR2* и *IL4RA* – с поливалентной сенсibilизацией. В подавляющем большинстве случаев статистически значимая ассоциация имеет место при взаимодействии с описторхозной инвазией.
12. С помощью подхода Model-Based Multifactor-Dimensionality Reduction выявлены 2-, 3- и 4-х компонентные генные и генно-средовые комбинации, ассоциированные с высоким и низким риском аллергических заболеваний и признаков (21 модель для бронхиальной астмы, 3 – для атопического дерматита, 10 – для кожных алергопроб, 7 – для поливалентной сенсibilизации, 19 – для уровня общего IgE и 18 – для степени тяжести астмы). В ряде случаев одни и те же генотипы или значения средового фактора (описторхозная инвазия) входят в сочетания высокого и низкого риска в зависимости от состава генотипов других генов, свидетельствуя о важности генного окружения в реализации генотип-фенотипических связей в развитии аллергий. Описторхоз входит в состав значительного числа полученных моделей, что демонстрирует важность этой гельминтной инвазии в модификации риска аллергий на предрасполагающем генетическом фоне, связанном с исследованными генами.
13. С помощью процедуры перекрестной проверки получены оценки прогностической и диагностической значимости MDR-моделей.

Максимальные значения точности классификации и предсказания получены для тяжести течения астмы (64,8%-84,1% и 64,5%-67,0% соответственно). Для бронхиальной астмы величины точности классификации и предсказания составили 61,5% и 58,4% соответственно, для атопического дерматита – 65,3% и 55,5% соответственно, для поливалентной сенсибилизации – 64,8% и 60,2% соответственно.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

Патенты

1. Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Черевко Н.А., Васильева М.В., Брагина Е.Ю., Салтыкова И.В. (Россия). Патент № 2383019. Российская Федерация. МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования риска развития бронхиальной астмы / №2008148685/15 // Бюллетень ФИПС. Москва, заявл. 09.12.2008; опубл. 27.02.2010. №6.
2. Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Салтыкова И.В., Куликов Е.С., Селиванова П.А., Сазонов А.Э. (Россия). Патент РФ № 2433401. Российская Федерация. МПК G01N33/48. Способ прогнозирования риска развития терапевтической резистентности у больных бронхиальной астмой. Выдан: 15.07.2010, опубликован: 10.11.2011.

Учебные пособия

3. Сеитова Г.Н., Буйкин С.В., Рудко А.А., Фрейдин М.Б. Наследственность и болезни легких (Наследственность и здоровье): Учебное пособие / Под ред. В.П. Пузырёва. Томск: «Печатная мануфактура», 2008. 64 с.

Главы в монографиях

4. Огородова Л.М., Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Кобякова О.С. Взаимосвязь генетических и внешнесредовых факторов в формировании клинического фенотипа бронхиальной астмы // Клинические рекомендации: Бронхиальная астма у взрослых. Атопический дерматит / Под ред. А.Г. Чучалина. М.: Издательский холдинг «Атмосфера», 2002. С. 23-42.
5. Пузырев В.П., Степанов В.А., Фрейдин М.Б. Молекулярные основы распространенных многофакториальных заболеваний / Геномика – медицине // Под ред. академика РАМН В.И. Иванова и академика РАН Л.Л. Киселева. М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. С. 100-137.
6. Фрейдин М.Б., Огородова Л.М., Цой А.Н., Бердникова Н.Г. Генетика бронхиальной астмы / Генетика бронхолегочных заболеваний: Монография //

Под ред. Пузырева В.П., Огородовой Л.М. (Серия монографий Российского респираторного общества; Гл. ред. серии Чучалин А.Г.). М.: Издательский холдинг «Атмосфера», 2010. С. 78-104.

Статьи в журналах

7. Огородова Л.М., Петровская Ю.А., Камалтынова Е.М., Петровский Ф.И., Пузырев В.П., Кулманакова И.М., Фрейдин М.Б., Еномото Т. Тяжелая бронхиальная астма у детей: факторы риска, течение // Пульмонология. 2002. №1. С. 68-71.
8. Огородова Л.М., Федорова О.С., Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б. Значение генетических предикторов для первичной профилактики бронхиальной астмы у детей с атопическим дерматитом // Педиатрия. 2005. № 6. С. 4-6.
9. Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Генетика атопии: современное состояние // Информационный вестник ВОГиС. 2006. Т. 10. № 3. С. 492-503.
10. Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Сазонов А.Э., Федорова О.С., Гербек И.Э., Черевко Н.А., Рудко А.А., Брагина Е.Ю., Перевозчикова Т.В., Файт Е.А., Лебедева Н.Ю. Изучение распространенности аллергической патологии и описторхозной инвазии и их взаимосвязи у населения Томской области // Бюллетень сибирской медицины. 2006. № 4. С. 48-51.
11. Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Геномные основы подверженности атопическим заболеваниям // Молекулярная медицина. 2007. № 3. С. 26-35.
12. Огородова Л.М., Федорова О.С., Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Петровская М.И. Генетические маркеры бронхиальной астмы у детей, больных атопическим дерматитом // Пульмонология. 2007. № 4. С. 37-40.
13. Огородова Л.М., Федорова О.С., Фрейдин М.Б., Васильева М.В., Черевко Н.А., Сазонов А.Э., Петрова И.В., Салтыкова И.В., Брагина Е.Ю., Куликов Е.С., Деев И.А. Характеристика эпидемиологических и молекулярных взаимоотношений аллергических и гельминтных болезней в эндемическом очаге описторхоза // Бюллетень сибирской медицины. 2008. № 4. С. 37-43.
14. Салтыкова И.В., Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Вовлеченность генов сигнальных молекул цитокинов в патогенезе бронхиальной астмы и описторхоза // Якутский медицинский журнал. 2009. № 2. С. 121-123.
15. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б. Генетический взгляд на феномен сочетанных заболеваний у человека // Acta Naturae. 2009. № 3. С. 57-63.

16. Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Синтропные гены аллергических заболеваний // Генетика. 2010. Т. 46. № 2. С. 224-229.
17. Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Сазонов А.Э., Фёдорова О.С., Деев И.А., Кремер Е.Э. Влияние инвазии *Opisthorchis felineus* на иммунный ответ при бронхиальной астме // Бюллетень сибирской медицины. 2010. Т. 9. № 3. С. 85-90.
18. Selivanova P.A., Kulikov E.S., Kozina O.V., Gereng E.A., Freidin M.B., Ogorodova L.M. Morphological and molecular characteristics of "difficult" asthma // Journal of Asthma. 2010. V. 47(3). P. 269-275.
19. Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Федорова О.С., Деев И.А., Куликов Е.С., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Полногеномный анализ ассоциаций аллергических заболеваний с молекулярными маркерами у русских жителей Западной Сибири // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. № 3. С. 464-472.
20. Ogorodova L.M., Freidin M.B., Sazonov A.E., Fedorova O.S., Gerbek I.E., Chervko N.A., Lebedeva E.Yu. A pilot screening of prevalence of atopic states and opisthorchosis and their relationship in people of Tomsk Oblast // Parasitology Research. 2007. V. 101(4). P. 1165-1168.
21. Puzyrev V.P., Makeeva O.A., Freidin M.B. Syntropy, genetic testing, and personalized medicine // Personalized Medicine. 2010. 7(4). P. 399-405.
22. Moffatt M.F., Gut I.G., Demenias F., Strakan D.P., Bouzigin E., Heath S., von Mutius E., Farrall M., Lathrop M., Cookson W.O.C.M., GABRIEL Consortium. (Collaborators (164): ...Watson W.T., Freidin M.B., Bragina E.Iu....). A large-scale consortium-based genomewide association study of asthma // New England Journal of Medicine. 2010. V. 363. P. 1211-1221.
23. Куликов Е.С., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Деев И.А., Рудко А.А., Селиванова П.А. Фармакогенетика неконтролируемой бронхиальной астмы // Российский аллергологический журнал. 2012. № 6. С. 6-14.
24. Фрейдин М.Б., Брагина Е.Ю., Салтыкова И.В., Деева Е.В., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Влияние дополнительной болезни (коморбидности) на ассоциацию аллергического ринита с вариантом rs12621643 гена *KCNE4* // Генетика. 2013. Т. 49. № 4. 541-544.
25. Melen E., Granell R., Kogevinas M., ... Daley D., Freidin M.B., Deev I.A. ... et al. Genome-wide association study of body mass index in 23,000 individuals with and without asthma // Clinical and Experimental Allergy. 2012. V. 43. P. 463-474.
26. Freidin M.B., Polonikov A.V. Validation of the *PPP1R12B* as a candidate gene for childhood asthma in Russians // Journal of Genetics. 2013. V. 92. P. 93-96.

27. Куликов Е.С., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Деев И.А., Селиванова П.А., Федосенко С.В., Кириллова Н.А. Молекулярные механизмы тяжелой бронхиальной астмы // Молекулярная медицина. 2013. №2. С. 24-32.
28. Куликов Е.С., Огородова Л.М., Фрейдин М.Б., Деев И.А., Селиванова П.А., Федосенко С.В., Кириллова Н.А. Молекулярные и фармакогенетические механизмы тяжелой бронхиальной астмы // Вестник РАМН. 2013. № 3. С. 15-23.

Тезисы

29. Огородова Л.М., Пузырев В.П., Фрейдин М.Б., Рудко А.А., Брагина Е.Ю., Черевко Н.А., Сазонов А.Э., Петрова И.В., Васильева М.В., Федорова О.С., Салтыкова И.В., Симакина А.Р., Кремер Е.Э., Спицко Ж.А., Мальцева О.А. Разработка алгоритма оценки риска аллергических заболеваний в регионах, эндемичных по гельминтой инвазии // Сб. тезисов по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления "Живые системы" ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы". Москва. 2008. С. 48-49.
30. Ozhegova D., Freidin M., Puzyrev V. Using the bioinformatic tools to choose the sNPs with highly possible phenotypic effect / European Human Genetics Conference 2008. May 31 – June 3, Barcelona, Spain // European Journal of Human Genetics. 2008. V. 16. Suppl. 2. P. 397.
31. Брагина Е.Ю., Рудко А.А., Фрейдин М.Б., Салтыкова И.В., Ан А.Р., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Взаимоотношение аллергических и инфекционных заболеваний на генетическом уровне // Сборник материалов VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (г. Москва, 10-11 ноября 2009 г.). С. 47-48.
32. Пузырев В.П., Фрейдин М.Б. Бронхиальная астма: модельный объект генетических исследований многофакториальных заболеваний человека. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков (г. Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г.). С. 148.
33. Салтыкова И.В., Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Роль генно-средовых взаимодействий в развитии бронхиальной астмы: описторхоз – SOCS5-IFNG / Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков (г. Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г.). С. 158.
34. Фрейдин М.Б., Полоников А.В. Оценка ассоциации детской бронхиальной астмы с позиционными генами-кандидатами *YWHAB* и *PPP1R12B* / Вопросы

сохранения и развития здоровья населения Севера и Сибири: материалы научно-практической конференции. Вып.11. // Под ред. В.Т. Манчука, С.В. Смирновой. Красноярск, 2012. С. 109.

35. Freidin M.B., Polonikov A.V. Validation of the *PPP1R12B* as a candidate gene for childhood asthma susceptibility (Электронный ресурс). Annual Meeting of American Society of Human Genetics, 6-10 November 2012, San Francisco, USA. Режим доступа: <http://abstracts.ashg.org/cgi-bin/2012/ashg12s?author=Freidin&sort=ptimes&sbutton=Detail&absno=120120020&sid=182060>.
36. Saltikova I.V., Bragina E.Y., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P., Freidin M.B. Immune-response modifying gene polymorphisms and susceptibility to asthma and *Opisthorchis felinus* helminth invasion / European Human Genetics Conference 2012. Nürnberg, Germany, June 23-26, 2012 // European Journal of Human Genetics. 2012. V. 20. Suppl. 1. P. 222.
37. Freidin M.B., Saltikova I.V., Bragina E.Yu., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. *Opisthorchis felinus* liver fluke modifies genetic risk of bronchial asthma and serum IgE levels / European Human Genetics Conference 2012. Nürnberg, Germany, June 23-26, 2012 // European Journal of Human Genetics. 2012. V. 20. Suppl. 1. P. 231.
38. M.B. Freidin, A.V. Polonikov. Validation of the *PPP1R12B* as a candidate gene for childhood asthma susceptibility / The 8th International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology. Novosibirsk, Russia, June 25-29. 2012. P.98.
39. Saltykova I., Freidin M., Bragina E., Ogorodova L., Puzyrev V. *Opisthorchis felinus* as environment factor modifying genetic risk of asthma / 22nd Annual Congress. Vienna, Austria, 1-5 September 2012 // European Respiratory Journal. 2012. Abstracts. P. 66s.
40. Брагина Е.Ю., Конева Л.А., Тийс Е.С., Фрейдин М.Б., Иванисенко В.А., Пузырев В.П. Общие генетические факторы патогенеза дистропных иммунозависимых болезней / Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. III международная научно-практическая конференция, 22-24 ноября 2012. г. Казань. Сборник тезисов. С. 277-278.
41. Конева Л.А., Брагина Е.Ю., Тийс Е.С., Фрейдин М.Б., Иванисенко В.А., Пузырев В.П. Использование ассоциативных сетей для анализа отношений сочетаемости многофакторных заболеваний человека / Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. III

международная научно-практическая конференция, 22-24 ноября 2012. г.
Казань. Сборник тезисов. С. 183-184.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – атопический дерматит
АЗ – аллергические заболевания
АР – аллергический ринит
БА – бронхиальная астма
ГО – генные онтологии
ДИ – доверительный интервал
ИЛ – интерлейкин(ы)
ЛА – лекарственная аллергия
МФЗ – многофакторные заболевания
ОНП – однонуклеотидный полиморфизм
ОШ – отношение шансов
ПА – пищевая аллергия
ПГАА – полногеномный анализ ассоциаций
ТРФ- β – трансформирующий ростовый фактор- β
AUC – Area under curve (площадь под ROC-кривой)
FDR – False Discovery Rate
IgE – иммуноглобулин-Е
KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MDR – Multifactor-Dimensionality Reduction
SE – Sensitivity (чувствительность)
SP – Specificity (специфичность)
Th1/Th2 – Т-лимфоциты 1 или 2 типа