

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

ФАРМАКОГЕНОМИКА РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА: АССОЦИАЦИЯ
ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА
С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ЛЕЧЕНИЯ КОПАКСОНОМ

© 2011 г. Е. Ю. Царева^{1,2}, О. Г. Кулакова^{1,2}, О. Ю. Макарьчева², А. Н. Бойко^{1,3}, С. Г. Щур³,
Н. Ю. Лащ^{1,3}, Н. Ф. Попова^{1,3}, Е. И. Гусев¹, В. В. Башинская¹, Д. В. Львов⁴,
А. В. Фаворов^{4,5}, М. Ф. Оchs⁵, О. О. Фаворова^{1,2*}

¹Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения и социального развития, Москва, 117997

²Российский кардиологический научно-производственный комплекс
Министерства здравоохранения и социального развития, Москва, 121552

³Московский городской центр рассеянного склероза, Москва, 127018

⁴Государственный научный центр “ГосНИИ генетика”, Москва, 113545

⁵Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US

Поступила в редакцию 15.12.2010 г.

Принята к печати 31.01.2011 г.

На выборке из 285 больных рассеянным склерозом, русских по этнической принадлежности, с помощью алгоритма APSampler проведен анализ ассоциации эффективности лечения иммуномодулирующим препаратом копаксоном (глатирамера ацетатом) с аллельным полиморфизмом ряда генов иммунного ответа, кодирующих интерферон β (*IFNB1*); трансформирующий фактор роста $\beta 1$ (*TGFB1*); интерферон γ (*IFNG*); фактор некроза опухолей (*TNF*), первую субъединицу рецептора интерферонов типа I (*IFNAR1*), рецептор СС-хемокинов 5 (*CCR5*), α -субъединицу рецептора интерлейкина 7 (*IL7RA*), антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (*CTLA4*) и β -цепь молекул главного комплекса гистосовместимости класса II (*DRB1*). Полученные результаты свидетельствуют о вкладе полиморфных вариантов генов *CCR5*, *DRB1*, *IFNG*, *TGFB1*, *IFNAR1*, *IL7RA*, а также, возможно, *TNF* и *CTLA4* в формирование ответа на прием копаксона. Аллели генов *CCR5* и *DRB1* значимо ассоциированы с эффективностью терапии по отдельности. Носительство полиморфных вариантов остальных генов дает более слабый, но значимый в составе би- или триаллельных сочетаний вклад в формирование ответа на копаксон. Это исследование может лечь в основу создания прогностического теста, позволяющего выбирать иммуномодулирующий препарат, эффективный для данного больного рассеянным склерозом.

Ключевые слова: фармакогеномика, человек, рассеянный склероз, копаксон, глатирамера ацетат, русские, аутоиммунное воспаление, цитокины, ДНК, гены, аллельный полиморфизм, полимеразная цепная реакция, APSampler.

PHARMACOGENOMICS OF MULTIPLE SCLEROSIS: ASSOCIATION OF IMMUNE RESPONSE GENES POLYMORPHISM WITH COPAXONE TREATMENT EFFICACY, by E. Yu. Tsareva^{1,2}, O. G. Kulakova^{1,2}, O. Yu. Makarycheva², A. N. Boyko^{1,3}, S. G. Shchur³, N. Yu. Lashch^{1,3}, N. F. Popova^{1,3}, E. I. Gusev¹, V. V. Bachinskaya¹, D. V. Lvov⁴, A. V. Favorov^{4,5}, M. F. Ochs⁵, O. O. Favorova^{1,2*} (Pirogov Russian State Medical University, Moscow, 117437 Russia; *e-mail: olga_favorova@mail.ru; ²Russian Cardiology Scientific and Production Center, Moscow, 121552 Russia; ³Moscow City Multiple Sclerosis Center, Moscow, 127018 Russia; ⁴State Research Center “GosNII Genetika”, Moscow, 113545 Russia; ⁵Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US). Complex association analysis of copaxone

Принятые сокращения: РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ПИТРС – препараты, изменяющие течение рассеянного склероза; ГКГ – главный комплекс гистосовместимости; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-SSP – ПЦР с использованием набора аллелеспецифичных праймеров; ДИ – доверительный интервал; ОШ – отношение шансов; EDSS – Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала оценки степени инвалидизации; Th1 и Th2 – Т-хелперы 1 и 2; белковые продукты генов (соответствующие гены даны курсивом): CCR5 – рецептор СС-хемокинов 5; CTLA4 – антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов; DRB1 – β -цепь молекул ГКГ класса II; IFNAR1 – первая субъединица рецептора интерферонов типа I; IFNB1 – интерферон β ; IFNG – интерферон γ ; IL7RA – α -субъединица рецептора интерлейкина 7; TGFB1 – трансформирующий фактор роста $\beta 1$; TNF – фактор некроза опухолей; группы больных: R – responders, больные с отчетливым положительным эффектом терапии; NR – non-responders, больные без отчетливого положительного эффекта терапии, DNR – definite non-responders, больные, определенно не ответившие на терапию.

* Эл. почта: olga_favorova@mail.ru

(glatiramer acetate) immunotherapy efficacy with allelic polymorphism in the number of immune response genes, which encode interferone β (*IFNB1*), transforming growth factor $\beta 1$ (*TGFB1*), interferone γ (*IFNG*), tumor necrosis factor (*TNF*), interferon α/β receptor 1 (*IFNAR1*), CC chemokine receptor 5 (*CCR5*), interleukin 7 receptor α subunit (*IL7RA*), cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (*CTLA4*) and HLA class II histocompatibility antigen β chain (*DRB1*) was performed with APSampler algorithm for 285 multiple sclerosis patients of Russian ethnicity. The results show evidence for the contribution of polymorphic variants in *CCR5*, *DRB1*, *IFNG*, *TGFB1*, *IFNAR1*, *IL7RA* and, probably, *TNF* and *CTLA4* genes to copaxone treatment response. Single alleles of *CCR5* and *DRB1* genes are reliably associated with treatment efficacy. Carriage of allelic variants of other above mentioned genes contribute with reliable effect to copaxone treatment response as part of bi- and three-allelic combinations only. Present investigation may support basis toward the future possibility of prognostic test realization, which can provide a personal choice of immunomodulatory treatment for a patient with multiple sclerosis.

Keywords: pharmacogenomics, human, multiple sclerosis, copaxone, glatiramer acetate, Russians, autoimmune inflammation, cytokines, DNA, genes, SNP, PCR, APSampler.

Рассеянный склероз (РС) — демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), в патогенезе которого большую роль играет аутоиммунный воспалительный процесс. При РС в организме больного развивается комплекс иммуноопосредованных патологических реакций, направленных на разрушение миелиновой оболочки нейронов. Центральную роль в этом играет активация клонов Т-лимфоцитов, специфичных к различным белкам миелиновой оболочки, и, в первую очередь, к основному белку миелина [1, 2]. Лечение больных РС остается серьезной проблемой современной медицины. Длительный прием препаратов, изменяющих течение РС (ПИТРС), к которым относят иммуномодуляторы копаксон (глатирамера ацетат), интерферон β (*IFNB1*), а также цитостатики митоксантрон и кладрибин, приводит к уменьшению числа обострений, задержке возникновения новых очагов демиелинизации и снижению скорости прогрессирования РС [3, 4].

Копаксон — это синтетический полипептид с мол. массой 5–11 кДа, который состоит из остатков L-глутаминовой кислоты, L-лизина, L-аланина и L-тирозина в том же соотношении, как в основном белке миелина [5]. Хотя точный механизм действия копаксона при РС до конца не известен, его благоприятный эффект связывают с индукцией копаксон-специфичных Th2-лимфоцитов и, вероятно, с конкуренцией с антигенными пептидами за молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) на антигенпрезентирующих клетках, что определяет, в свою очередь, подавление активации миелин-реактивных Th1-клеток. Воздействие копаксона приводит также к уменьшению продукции Th1- и увеличению продукции Th2-цитокинов и обеспечивает нейропротективный эффект в ЦНС за счет синтеза нейротрофных факторов [5–8]. Эффективность копаксона выявлена в многочисленных клинических испытаниях, однако у разных больных она может варьировать от высокой до полного отсутствия влияния на течение РС [9–11]. При этом вывод о

действенности терапии для каждого больного РС можно сделать только после длительного приема препарата. К сожалению, к тому времени, когда будет вынесено решение об отмене препарата, неврологическое состояние больного может ухудшиться, поэтому очень важно, чтобы больные РС, не отвечающие на тот или иной препарат ПИТРС, имели возможность получить альтернативную терапию как можно раньше. Аллельные варианты, влияющие на эффективность лекарственного средства, могут служить маркерами, которые определяют выбор схемы терапии для конкретного больного, поэтому поиск таких маркеров является основной задачей фармакогеномики.

Фармакогеномные исследования эффективности копаксона при РС находятся в начальной стадии. Опубликовано лишь несколько работ, в которых рассмотрено значение полиморфизма генов ГКГ класса II [11, 12]. В отдельных работах анализировали также ассоциацию полиморфизма генов, кодирующих Т-клеточный рецептор, некоторые цитокины и белки миелина, с эффективностью копаксона при РС [13, 14].

Цель нашей работы — комплексный анализ совместного вклада ряда генов иммунного ответа в эффективность применения копаксона при РС. Исходя из представлений о влиянии копаксона на иммунопатогенез РС, мы выбрали гены, кодирующие важные про- и противовоспалительные цитокины, рецепторы цитокинов и хемокинов, а также гены ГКГ. Это гены интерферона β (*IFNB1*), трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (*TGFB1*), интерферона γ (*IFNG*), фактора некроза опухолей (*TNF*), первой субъединицы рецептора интерферонов типа I (*IFNAR1*), рецептора CC-хемокинов 5 (*CCR5*), α -субъединицы рецептора интерлейкина 7 (*IL7RA*), антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (*CTLA4*) и β -цепи молекул ГКГ класса II (*DRB1*). Анализировали участки этих генов, аллельный полиморфизм которых, согласно опубликованным данным, имеет функциональное значение. Проведено геномное типирование по названным генам больных РС, с разной эффективностью отве-

тивших на терапию копаксоном, с последующим анализом с помощью алгоритма APSampler вклада их полиморфизма в эффективность лечения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. Ретроспективное исследование проводили методом случай-контроль с использованием образцов ДНК 285 неродственных русских больных РС, проходивших лечение в Московском городском центре рассеянного склероза. Диагноз РС был поставлен согласно критериям Макдональда [15]. Средний возраст больных \pm стандартное отклонение — 40.3 ± 10.4 лет; соотношение мужчины : женщины составило 1 : 2.4; дебют заболевания в возрасте — 27.0 ± 8.8 лет в среднем; средняя длительность РС — 11.1 ± 7.5 лет; медиана (диапазон) показателей EDSS — 2.0 (1.0–6.5). Все индивиды давали информированное согласие на использование их ДНК для исследования.

Все больные получали копаксон (20 мг подкожно ежедневно) в качестве ПИТРС не менее 2 лет. На каждого из них была составлена унифицированная анкета, включавшая пол, возраст, клинические симптомы дебюта РС, возраст дебюта, форму течения и длительность РС, тяжесть течения РС по шкале инвалидизации EDSS (Expanded Disability Status Scale, расширенная шкала оценки степени инвалидизации). Лечение считали эффективным, если у больных РС в течение всего времени приема копаксона не наблюдали обострений и нарастания неврологического дефицита по шкале инвалидизации EDSS.

Геномную ДНК выделяли из периферической крови с использованием экстракции смесью фенол-хлороформ с помощью модифицированного метода [16].

Геномное типирование проводили методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Маркером молекулярной массы служила плазида pUC19, обработанная рестрикционной эндонуклеазой MspI. ПЦР проводили в амплификаторе MC16 (АО “ДНК-Технология”, Россия).

Геномное типирование локуса HLA-DRB1 проводили с использованием коммерческого набора для ПЦР с аллелеспецифичными праймерами (“ДНК-Технология”, Россия). Проводили двухэтапную ПЦР, позволяющую амплифицировать все известные аллели гена DRB1 и разделить их на группы, соответствующие серологическим специфичностям от DR1 до DR18. ПЦР-продукты гена DRB1 анализировали в стандартном 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии бромида этидия [17].

Методом ПЦР-SSP проводили геномное типирование полиморфных участков $-308G>A$ гена TNF (rs1800629) [18], $-509C>T$ гена TGFBI (rs1800469) [19] и $874T>A$ гена IFNG (rs2430561)

[20, 21]. Геномное типирование полиморфного участка $49A>G$ гена CTLA4 (rs231775) проводили методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР с использованием рестрикционной эндонуклеазы BstEII [22]. Геномное типирование участка “дикий тип” \rightarrow делеция 32 п.н. гена CCR5 ($w \rightarrow d$) проводили методом ПЦР с праймерами, фланкирующими область делеции [23].

Геномное типирование полиморфного участка $153T>C$ в гене IFNBI (rs1051922) проводили методом ПЦР-SSP. Фрагмент ДНК длиной 238 п.н., содержащий этот участок, амплифицировали с использованием аллелеспецифичных праймеров: $5'-TCATCCTGTCCTTGAGGCAG-3'$ (SSP C), $5'-TCATCCTGTCCTTGAGGCAA-3'$ (SSP T) и праймера $5'-CTGCAACCTTTCGAAGCCTTT-3'$, сконструированных с помощью программы Primo (<http://www.changbioscience.com/primo/>). Для амплификации фрагмента длиной 450 п.н., служащего внутренним положительным контролем амплификации, использовали контрольный праймер $5'-CTCCA-GTTTTTCTTCCAGGAC-3'$. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 70 mM Трис-НСI, pH 9.5, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM $MgCl_2$, 0.025% Tween 20, 0.025% NP-40, по 5 пмоль каждого праймера, 0.2 mM dNTP, 0.5 ед. акт. Таq-полимеразы и 100–200 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 1) $95^\circ C - 5$ мин; 2) 10 циклов: $95^\circ C - 1$ мин; $64^\circ C - 1$ мин; $72^\circ C - 1$ мин; 3) 20 циклов: $95^\circ C - 30$ с; $60^\circ C - 50$ с; $72^\circ C - 50$ с. Присутствие продуктов амплификации проверяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия, и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Геномное типирование полиморфного участка $16725G > C$ гена IFNARI (rs1012335) проводили методом ПЦР-SSP. Фрагмент ДНК длиной 237 п.н., содержащий этот участок, амплифицировали с использованием аллелеспецифичных праймеров: $5'-GCAACAAGAACAACAACTCTGTG-3'$ (SSP C), $5'-GCAACAAGAACAACAACTCTGTG-3'$ (SSP G) и праймера $5'-GGAGGCTGTTTGATGTGTGATG-3'$, сконструированных с помощью программы Primo. Для амплификации фрагмента длиной 443 п.н., служащего внутренним положительным контролем, использовали контрольный праймер $5'-TGGGCAGATCACCTGAGGTTG-3'$. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 70 mM Трис-НСI, pH 9.5, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1 mM $MgCl_2$, 0.025% Tween 20, 0.025% NP-40, по 5 пмоль каждого праймера, 0.2 mM dNTP, 0.5 ед. акт. Таq-полимеразы, 0.2 мкг моноклональных антител к активному центру Таq-полимеразы и 100–200 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 1) $95^\circ C - 5$ мин; 2) 10 циклов: $95^\circ C - 1$ мин; $60^\circ C - 1$ мин; $72^\circ C - 1$ мин.; 3) 20 циклов: $95^\circ C - 30$ с; $56^\circ C - 50$ с; $72^\circ C - 50$ с. Присут-

ствие продуктов амплификации проверяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия, и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Геномное типирование полиморфного участка С→Т (Thr244Ile) в экзоне 6 гена *IL7RA* (rs6897932) проводили методом ПЦР-SSP. Фрагмент ДНК длиной 278 п.н., содержащий этот участок, амплифицировали с использованием аллелеспецифичных праймеров: 5'-AGATGGATCCTATCTTAC-TAAC-3' (SSP C), 5'-GAGATGGATCCTATCTTAC-TAAT-3' (SSP T) и праймера 5'-TTCGTGA-AATGCCTTAATCCCC-3', сконструированных с помощью программы Primo. В случае фрагмента длиной 426 п.н., служащего внутренним положительным контролем амплификации, использовали контрольный праймер 5'-ACATTTCAAGTG-GCAGATGCTC-3'. Амплификацию проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 70 мМ Трис-HCl, pH 9.5, 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 1 мМ MgCl₂, 0.025% Tween 20, 0.025% NP-40, по 5 пмоль каждого праймера, 0.2 мМ dNTP, 0.5 ед. акт. Taq-полимеразы, 0.2 мкг моноклональных антител к активному центру Taq-полимеразы и 100–200 нг геномной ДНК. Программа амплификации: 1) 95°C – 5 мин; 2) 10 циклов: 95°C – 1 мин; 62°C – 1 мин; 72°C – 1 мин; 3) 20 циклов: 95°C – 30 с; 56°C – 50 с; 72°C – 50 с. Присутствие продуктов амплификации проверяли методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия, и визуализировали в проходящем УФ-свете.

Статистический анализ. Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди–Вайнберга проверяли по критерию χ^2 . Для выявления значимых ассоциаций носительства сочетаний аллелей/генотипов с эффективностью терапии больных РС копаксоном применяли алгоритм APSampler, использующий метод Монте-Карло Марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику [24]. Уровень значимости найденных сочетаний проверяли программными средствами для валидации, входящими в программу APSampler (<http://www.cancerbiostats.onc.jhmi.edu/APSampler.cfm>), на основании точного критерия Фишера и оценки соответствующего отношения шансов (ОШ) и его 95%-ного доверительного интервала (ДИ). ОШ больше 1 характеризует позитивную ассоциацию сочетания аллелей/генотипов с эффективностью терапии больных РС копаксоном. Мы применяли односторонний точный критерий Фишера, поскольку программа APSampler вместе с сочетанием аллелей указывает также и знак наблюдаемой ассоциации. Значимым считали различие сравниваемых частот при $p < 0.05$ при условии, что значения 95% ДИ для ОШ не пересекают 1. Если число носителей/неносителей сочетания равно нулю, и вычисление ОШ и 95% ДИ обычным спо-

собом невозможно, то для их оценки программа APSampler использовала метод Пето [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании унифицированных критериев оценки эффективности лечения была сформирована группа больных с отчетливым положительным эффектом терапии копаксоном (группа “responders”, R, 130 человек). Все остальные больные, без отчетливого положительного эффекта терапии, составили группу “non-responders” (NR, 155 человек). В нее вошли как больные, не ответившие на лечение, так и больные со слабо выраженным или с неоднозначным по используемым клиническим показателям ответом на терапию. В составе группы NR выделена также группа больных, определенно не ответивших на терапию копаксоном (“definite non responders”, DNR, 84 человек).

У больных РС проведено геномное типирование групп аллелей гена *DRB1* ГКГ класса II, соответствующих специфичностям DR1-DR18, и следующих биаллельных полиморфизмов: –308G>A в промоторной области гена *TNF*, –509C>T в промоторной области гена *TGFB1*, 49A>G в первом экзоне гена *CTLA4*, 874T>A в первом интроне гена *IFNG*, 153T>C в кодирующей области гена *IFNB1* (синонимическая замена Tyr51Tyr), 16725G>C в третьем интроне гена *IFNARI*, С→Т в экзоне 6 гена *IL7RA* (Thr244Ile) и инсерционно-делеционного полиморфизма (w→d) гена *CCR5*. Анализ распределения частот аллелей и генотипов всех рассматриваемых полиморфных участков с помощью критерия χ^2 показал, что у больных РС соблюдается равновесие Харди–Вайнберга.

При сравнении групп R и NR больных РС с помощью алгоритма APSampler показано, что с эффективностью лечения копаксоном значимо ассоциировано носительство ряда сочетаний, содержащих те или иные аллели или генотипы восьми из девяти генов, за исключением гена *IFNB1*. Наиболее информативные сочетания представлены в табл. 1 в порядке понижения уровня значимости. Число аллелей/генотипов (N) в этих сочетаниях варьировало от одного (в случае генов *CCR5* и *DRB1*) до трех. Частота носительства аллеля *DRB1**4 (строка 7, табл. 1) была значимо выше в группе R ($p = 0.027$, ОШ = 1.9). Носительство аллеля *CCR5**d и генотипа *CCR5**d/d (строки 10 и 12, табл. 1) было неблагоприятным фактором (ОШ = 0.6 и 0.16 соответственно), тогда как носительство генотипа *CCR5**w/w и аллеля *CCR5**w (строки 11 и 13, табл. 1) (ОШ = 1.7 и 6.4 соответственно), напротив, положительно ассоциировано с эффективностью лечения (во всех случаях $p < 0.05$).

Все представленные в табл. 1 сочетания, где $N > 1$ – минимальные множества аллелей. Под этим понимается, что добавление в такое множе-

Таблица 1. Сочетания аллелей/генотипов генов *CCR5*, *DRB1*, *CTLA4*, *IFNG*, *TGFBI*, *TNF*, *IFNARI* и *IL7RA*, носительство которых ассоциировано с эффективностью терапии копаксоном при сравнении групп больных рассеянным склерозом, ответивших (R) и не ответивших (NR) на лечение

Строка, №	Гены в составе сочетания							Эффективность лечения копаксоном		p	ОШ (95% ДИ)	
	<i>CCR5</i> w → d	<i>DRB1</i>	<i>CTLA4</i> 49A>G	<i>IFNG</i> 874T>A	<i>TGFBI</i> -509C>T	<i>TNF</i> -308G>A	<i>IFNARI</i> 16725G>C	<i>IL7RA</i> Thr244Ile*	R n = 130			NR n = 155
	Носительство аллелей/генотипов							Носители (%)/неносители (%) сочетания				
1	d	15	-	-	T	-	-	-	1 (0.8)/128 (99.2)	14 (9.0)/141 (91.0)	0.0012	0.08 [0.01–0.6]
2	-	4	-	-	-	-	T	T	19 (15)/110 (85)	7 (4.5)/148 (95.5)	0.0027	3.7 [1.5–9.0]
3	d	11	-	-	-	-	-	-	2 (1.5)/127 (98.5)	14 (9)/141 (91)	0.0049	0.2 [0.04–0.7]
4	d	-	-	-	-	G	C	C	16 (12.5)/112 (87.5)	36 (23)/119 (77)	0.014	0.5 [0.2–0.9]
5	d	-	-	-	T	G	-	-	8 (6)/121 (94)	23 (15)/132 (85)	0.015	0.4 [0.2–0.9]
6	-	4	A	-	-	-	-	-	25 (19.2)/105 (80.8)	15 (9.7)/140 (90.3)	0.016	2.2 [1.1–4.4]
7	-	4	-	-	-	-	-	-	30 (23)/100 (77)	21 (13.5)/134 (86.5)	0.027	1.9 [1.0–3.5]
8	d	-	-	-	G/G	-	-	-	14 (11)/114 (89)	31 (20)/124 (80)	0.027	0.5 [0.2–0.97]
9	-	-	-	T	-	A	-	-	26 (20)/103 (80)	18 (11)/137 (89)	0.035	1.9 [1.0–3.7]
10	d	-	-	-	-	-	-	-	21 (16)/108 (84)	39 (25)/116 (75)	0.046	0.6 [0.3–1.0]
11	w/w	-	-	-	-	-	-	-	108 (84)/21 (16)	116 (75)/39 (25)	0.046	1.7 [1.0–3.1]
12	d/d	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)/129 (100)	5 (3)/150 (97)	0.047	0.16 [0.03–0.9]
13	w	-	-	-	-	-	-	-	129 (100)/0 (0)	150 (97)/5 (3)	0.047	6.4 [1.09–37.8]

*Соответствует замене C → T в экзоне 6 гена *IL7RA*.
Примечание. Жирным выделены сочетания аллелей/генотипов, частоты которых ассоциированы с эффективным лечением копаксоном (ОШ > 1).

Таблица 2. Сочетания аллелей генов *CCR5*, *DRB1*, *IFNG*, *TGFBI*, *IFNARI* и *IL7RA*, носительство которых ассоциировано с эффективностью лекарственной терапии копаксоном при сравнении групп больных рассеянным склерозом, ответивших (R) и определенно не ответивших (DNR) на лечение

Строка, №	Гены в составе сочетания						Эффективность лечения копаксоном		<i>p</i>	ОШ (95% ДИ)
	<i>CCR5</i> w→d	<i>DRB1</i>	<i>IFNG</i> 874T>A	<i>TGFBI</i> -509C>T	<i>IFNARI</i> 16725G>C	<i>IL7RA</i> Thr244Ile*	R <i>n</i> = 130	DNR <i>n</i> = 84		
	Носительство аллелей/генотипов						Носители (%) / неносители (%) сочетания			
1	d	15	–	T	–	–	1 (1)/128 (99)	9 (11)/75 (89)	0.0012	0.07 [0.008–0.5]
2	–	–	T	–	–	T	39 (30)/89 (70)	14 (17)/70 (83)	0.016	2.2 [1.1–4.4]
3	–	–	T	–	C	–	53 (41)/76 (59)	22 (26)/62 (74)	0.018	2.0 [1.1–3.6]
4	d	–	–	T	G	–	8 (6)/121 (94)	13 (15)/71 (85)	0.025	0.4 [0.1–0.9]
5	–	4	–	–	–	T	19 (15)/110 (85)	5 (6)/79 (94)	0.036	2.7 [1.0–7.6]
6	–	15	–	–	–	–	54 (42)/76 (58)	46 (55)/38 (45)	0.040	0.6 [0.3–1.0]

*Соответствует замене C → T в экзоне 6 гена *IL7RA*.

Примечание. Жирным выделены сочетания аллелей, частоты которых ассоциированы с эффективным лечением копаксоном (ОШ > 1).

ство каких-либо дополнительных аллелей не увеличивает значимости его ассоциации с эффективностью лечения (т.е. не уменьшает величину *p*), а любое подмножество этого множества характеризуется меньшей значимостью ассоциации с признаком. Среди выявленных сочетаний три – триаллельные, содержат общий аллель *CCR5**d и негативно ассоциированы с эффективностью терапии копаксоном (строки 1, 4 и 5). Наибольшим уровнем значимости характеризуется сочетание, в дополнение к *CCR5**d включающее аллели *DRB1**15 и *TGFBI**T (строка 1, *p* = 0.0012, ОШ = 0.08). Остальные триаллельные сочетания включают *IFNARI**G. В одно из них третьим компонентом входит аллель *IL7RA**C (строка 4 табл. 1, *p* = 0.014, ОШ = 0.5), а во второе – *TGFBI**T (строка 5, *p* = 0.015, ОШ = 0.4). В соответствии с критерием минимального множества аллелей обнаружены также некоторые значимые биаллельные сочетания, представляющие собой подмножества этих триаллельных сочетаний (*p* от 0.015 до 0.033) (в табл. 1 не включены).

Остальные пять сочетаний, представленных в табл. 1, биаллельные. Большинство из них несет аллели *DRB1*. Сочетание *DRB1**11 в паре с *CCR5**d (строка 3, *p* = 0.0049, ОШ = 0.2) ассоциировано с неэффективной терапией, а носительство сочетаний, включающих аллель *DRB1**4 в паре с *IL7RA**T (строка 2, *p* = 0.0027, ОШ = 3.7) или с *CTLA4**A (строка 6, *p* = 0.016, ОШ = 2.2), выше в группе больных, положительно отвечающих на копаксон. Сочетание *DRB1**4 + *IL7RA**T характеризуется наибольшей значимостью среди всех биаллельных сочетаний, и величина *p* для него на порядок ниже, чем в случае носительства аллеля *DRB1**4. Еще два биаллельных сочетания со-

держат генотип G/G гена *TNF* в сочетании с делецией гена *CCR5* (строка 8, *p* = 0.027, ОШ = 0.5) и аллель *TNF**A в сочетании с *IFNG**T (строка 9, *p* = 0.035, ОШ = 1.9).

Эти результаты согласуются с представлением о суммировании независимых вкладов отдельных генов в формирование ответа на лечение. При этом в ряде случаев удастся наблюдать разнонаправленное влияние носительства альтернативных аллелей одного гена на эффективность лечения (это касается генов *CCR5*, *TNF* и *IL7RA*). Аллель d гена *CCR5* входит в большинство сочетаний, носительство которых выше в группе больных с неэффективной терапией (диапазон ОШ от 0.2 до 0.8). То же справедливо для аллелей *TGFBI**T, *IFNARI**G, *TNF**G (в составе генотипа G/G) и *IL7RA**C. Носительство аллелей *DRB1**11 и *DRB1**15 ассоциировано с неэффективным, а *DRB1**4 – с эффективным лечением.

Как указывалось выше, из числа больных без отчетливого положительного эффекта копаксона выделена группа больных, определенно не ответивших на терапию (DNR). В табл. 2 представлены результаты комплексного анализа, полученные при сравнении групп R и DNR. Они свидетельствуют о вкладе в эффективность терапии копаксоном полиморфизма тех же генов, что и при сравнении R vs NR (см. табл. 1), за исключением генов *TNF* и *CTLA4*. Три сочетания присутствуют и в табл. 1: это *CCR5**d + *DRB1**15 + *TGFBI**T (строка 1 табл. 2, *p* = 0.0012, ОШ = 0.07), *CCR5**d + *TGFBI**T + *IFNARI**G (строка 4, *p* = 0.025, ОШ = 0.4) и *DRB1**4 + *IL7RA**T (строка 5, *p* = 0.036, ОШ = 2.7). Остальные два биаллельных сочетания (строки 2 и 3), оба с ОШ > 1, не дублировали

Таблица 3. Частоты аллелей *CCR5*_w*, *CCR5*_d*, *DRB1*₄* и *DRB1*₁₅* у больных рассеянным склерозом в зависимости от эффективности лечения копаксоном (группы R, NR и DNR)

Аллель	R <i>n</i> = 129	NR <i>n</i> = 155	DNR <i>n</i> = 84	Величина <i>p</i> при попарном сравнении, ОШ [95% ДИ] для значимых отличий	
	Аллели, число (%)			R vs NR	R vs DNR
<i>CCR5*_w</i>	237 (91.9)	266 (85.8)	146 (86.9)	0.016 1.9 [1.1–3.2]	Н.з.
<i>CCR5*_d</i>	21 (8.1)	44 (14.2)	22 (13.1)	0.016 0.5 [0.3–0.9]	Н.з.
<i>DRB1*₄</i>	32 (12.3)	21 (6.8)	15 (8.9)	0.017 1.9 [1.1–3.4]	Н.з.
<i>DRB1*₁₅</i>	58 (22.5)	88 (28.4)	52 (31)	Н.з.	0.033 0.6 [0.4–1.0]

Примечание. Жирным выделены аллели, частоты которых ассоциированы с эффективным лечением копаксоном (ОШ > 1). Н.з. – незначимые отличия. R, NR и DNR – группы больных, ответивших, не ответивших и определенно не ответивших на лечение копаксоном соответственно.

представленные в табл. 1, но хорошо согласовались с ее результатами. Действительно, оба они содержали ранее выявленный “благоприятный” аллель *IFNG*_T* в паре с “благоприятным” аллелем *IL7RA*_T* (строка 2) или с аллелем *IFNARI*_C*, альтернативным ранее выявленному “неблагоприятному” аллелю G этого гена (строка 3). Наблюдали также значимый негативный вклад в эффективность терапии копаксоном носительства одного аллеля *DRB1*₁₅* (строка 6 табл. 2, *p* = 0.04, ОШ = 0.6), который, по данным табл. 1, проявлял свое негативное действие только в составе триаллельного сочетания. Таким образом, данные, полученные при сравнении R vs DNR, убедительно подтверждают результаты сравнения R vs NR.

Проведенный анализ основан на выявлении носительства отдельными индивидами сочетаний аллелей/генотипов, ассоциированных с признаком. Он позволил найти значимые ассоциации носительства отдельных аллелей/генотипов с эффективностью копаксона при РС: негативные (*CCR5*_d*, *CCR5*_{d/d}* и *DRB1*₁₅*) и позитивные (*CCR5*_w*, *CCR5*_{w/w}* и *DRB1*₄*). Для сравнения распределения частот аллелей *CCR5*_d*, *CCR5*_w*, *DRB1*₄* и *DRB1*₁₅* мы провели их попарное сравнение в группах R vs NR и R vs DNR (табл. 3). Выявлены различия в частотах каждого из этих аллелей в тех же группах сравнения, что и при комплексном анализе носительства, но с большим уровнем значимости.

В целом, по результатам проведенного анализа можно сделать вывод о вкладе полиморфных вариантов генов *CCR5*, *DRB1*, *IFNG*, *TGFB1*, *IFNARI* и *IL7RA* в формирование ответа на копаксон у русских больных РС. В отношении генов *CTLA4* и *TNF*, ассоциацию аллелей которых с эффективностью лечения мы наблюдали только при одном из двух сравнений, аналогичный вывод носит пред-

варительный характер. Аллели/генотипы *CCR5* встречаются в большинстве сочетаний, а аллели *DRB1* – почти в половине сочетаний. При этом аллели генов *CCR5* и *DRB1* по отдельности значимо ассоциированы с различной эффективностью терапии. Полиморфные варианты других генов, вовлеченных в аутоиммунное воспаление при РС (*IFNG*, *TGFB1*, *IFNARI*, *IL7RA*, *CTLA4* и *TNF*), вносят более слабый, но значимый в составе би- и триаллельных сочетаний вклад в формирование ответа на копаксон. Во всех случаях соблюдается закономерность: аллель того или иного полиморфного участка, входящий в ассоциированные с успешным лечением сочетания, альтернативен аллелю из “неблагоприятных” сочетаний.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе с помощью алгоритма APSampler проведен поиск сочетаний аллелей/генотипов, ассоциированных с эффективностью лечения больных РС копаксоном. В соответствии с результатами проведенных ранее исследований (см., например, [9–11]), в работе, выполненной на группе больных русского происхождения, копаксон оказался высоко эффективным ПИТРС менее чем у половины больных. Учитывая высокую стоимость этого препарата, рассчитанного на длительное применение, и отсутствие клинических критериев, позволяющих быстро оценить его эффективность, становится очевидной актуальность фармакогеномных исследований, направленных на выявление генетических маркеров эффективности лечения.

Нами представлено первое фармакогенетическое изучение эффективности действия копаксона, в котором на большой группе больных параллельно проанализировано влияние девяти генов.

Выявлено, что в формирование ответа больных РС на копаксон безусловный вклад вносят полиморфные локусы генов *DRB1* и *CCR5*. Аллели только этих генов по отдельности ассоциированы с различной эффективностью терапии, и аллели этих генов в комбинациях с аллелями других генов встречаются в большинстве сочетаний, выявленных при сравнении как групп R vs NR, так и групп R vs DNR.

Исследования эффективности копаксона при РС, проводимые в мире, в первую очередь, касались гена *HLA-DRB1* – главного фактора генетической предрасположенности к РС [26], что объясняется участием продуктов этого высокополиморфного гена в формировании тримолекулярного комплекса с пептидами копаксона и Т-клеточным рецептором. По нашим данным, носительство аллеля *DRB1*4* как поодиночке (при сравнении R vs NR), так и в сочетании с аллелем с *IL7RA*Т* (при сравнении R vs NR и R vs DNR) и *CTLA4*А* (при сравнении R vs NR) значительно выше в группе больных R, т.е. может использоваться в качестве маркера, определяющего выбор копаксона для терапии РС. В то же время носительство аллеля *DRB1*15* как поодиночке (при сравнении R vs DNR), так и в составе сочетаний (при сравнении R vs NR и R vs DNR), по нашим данным, является неблагоприятным прогностическим признаком. Следует отметить, однако, что наши результаты о роли аллеля *DRB1*15* не согласуются с данными фармакогенетического изучения копаксона, проведенного на итальянских больных РС [11] и в исследовании CLIMB (Бостон, США) [12]. Еще в одной работе (European/Canadian MRI) на выборке европеоидов не выявлено ассоциации носительства *HLA-DRB1*1501* с эффективностью терапии копаксоном [13]. Наблюдаемые противоречия могут быть связаны как с разным этническим составом больных в отдельных выборках, так и с малочисленностью больных, включенных в описанные исследования (44 человека в [11] и 74 человека в [13]). Определенную роль в неоднозначности оценок могло сыграть и использование отличных от наших критериев выбора групп, таких как длительность периода без новых проявлений болезни на фоне лечения копаксоном [12].

При анализе роли *HLA-DRB1* в формировании эффективности применения копаксона мы наблюдали вовлечение различных групп аллелей гена *DRB1* (*04, *11, *15). Эту аллельную гетерогенность локуса *DRB1* как фактора эффективности лечения можно связать, как и в случае риска РС [26], со сложными взаимодействиями аллелей *DRB1 in trans*, определяющими баланс между направленностью воздействия [27].

Ген *CCR5*, аллели которого, как и гена *DRB1*, ассоциированы по отдельности с различной эффективностью копаксона, кодирует рецептор

СС-хемокинов (MIP-1 α , MIP-1 β и RANTES). Этот рецептор принимает участие в одном из важнейших этапов патогенеза РС – в проникновении активированных Т-клеток через гематоэнцефалический барьер [28], а делеция 32 п.н. в кодирующей части его гена приводит к образованию нефункциональной формы рецептора. По нашим данным, носительство аллеля гена *CCR5* с делецией 32 п.н. может указывать на неэффективность лечения больных РС копаксоном. Исходя из общепринятого механизма действия копаксона, можно предположить, что продукция нефункциональной формы рецептора приводит к уменьшению проникновения в ЦНС не только аутореактивных Т-клеток, но и копаксон-специфичных Th2-лимфоцитов.

В нашей работе показано также, что полиморфные варианты генов, кодирующих некоторые цитокины (*IFNG*, *TGFB1* и, возможно, *TNF*) и рецепторы цитокинов (*IFNAR1*, *IL7RA*), вносят более слабый, но значимый вклад в формирование различий в ответе на копаксон. При этом тот факт, что аллели генов *IFNAR1*, *IL7RA* и *TNF*, входящие в сочетания, ассоциированные с эффективностью терапии копаксоном, альтернативны аллелям, ассоциированным с неэффективной терапией, служит важным аргументом в пользу значимости наблюдаемых связей. Ассоциации полиморфизма генов, кодирующих белки, вовлеченные в развитие аутоиммунного ответа, с эффективностью применения копаксона при РС ранее анализировали только в двух работах, выполненных на очень небольших выборках (менее 80 больных). Одна из них касалась только гена *IL12B* [14], в другой анализировали панель из 27 генов, включающую гены Т-клеточного рецептора, некоторых цитокинов и хемокинов, их рецепторов, костимулирующих молекул, аутоантигенов, протеаз и белков, участвующих в апоптозе [13]. В последней работе не выявлено ассоциаций между эффективностью копаксона и полиморфизмами в генах *IFNG*, *CTLA4* и *TGFB1*, обнаруженными в нашей работе.

В последние годы становится очевидным, что для фармакогеномного анализа, как и для изучения генетической предрасположенности к полигенным заболеваниям, недостаточно оценивать вклад аллелей отдельных генов в общую эффективность терапии, поскольку этот вклад может быть малым и трудно выявляемым. Мы впервые провели анализ ассоциации эффективности копаксона в терапии РС с носительством сочетаний аллелей и генотипов нескольких генов. Этот анализ стал возможен благодаря разработанному нами ранее алгоритму APSampler [24]. Полученные данные позволяют предполагать аддитивность вкладов отдельных генов в эффективность применения копаксона при РС, благодаря чему при анализе сочетаний удастся перейти порог значимости. В известном смысле это может отражать

механизм формирования ответа на лекарственное средство в случае полигенных заболеваний.

В целом, проведенное исследование свидетельствует об удачном выборе генов-кандидатов на роль предикторов эффективности копаксона как иммуномодулирующего препарата, который влияет на основные этапы развития аутоиммунного воспалительного процесса при РС и создает реальную основу для создания прогностического теста, позволяющего выбирать ПИТРС для конкретного больного.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (08-04-01834-а) и программой UERNA*MS FP7 Marie Curie Initial Training Network.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bruck W. 2005. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J. Neurol.* **252** Suppl 5, V3–V9.
2. Prat A., Antel J. 2005. Pathogenesis of multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **18**, 225–230.
3. Khan O.A., Tselis A.C., Kamholz J.A., Garbern J.Y., Lewis R.A., Lisak R.P. 2001. A prospective, open-label treatment trial to compare the effect of IFN beta-1a (Avonex), IFNbeta-1b (Betaseron), and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **8**, 141–148.
4. Бойко А.Н., Давыдовская М.В., Демина Т.Л., Лаш Н.Ю., Овчаров В.В., Попова Н.Ф., Синбухова Н.И., Хачанова Н.В., Шур С.Г., Гусев Е.И. 2006. Результаты длительного использования копаксона и бетаферона в Московском городском центре рассеянного склероза: оценка эффективности и приверженности к терапии. *Журн. неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. Рассеянный склероз.* **3**, 101–110.
5. Dhib-Jalbut S. 2002. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology.* **58** (Suppl 4), S3–S9.
6. Гусев Е.И., Бойко А.Н. 2004. Патогенетическое лечение рассеянного склероза. В кн. *Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания*. М.: Миклош, 357–384.
7. Freedman M.S. 2006. Disease-modifying drugs for multiple sclerosis: current and future aspects. *Expert. Opin. Pharmacother.* **7** (Suppl 1), S1–S9.
8. Tullman M.J., Lublin F.D., Miller A.E. 2002. Immunotherapy of multiple sclerosis – current practice and future directions. *J. Rehabil. Res. Dev.* **39**(2), 273–285.
9. Comi G., Filippi M., Wolinsky J.S. 2001. European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. *Ann. Neurol.* **49**(3), 290–297.
10. Johnson K.P., Brooks B.R., Cohen J.A., Ford C.C., Goldstein J., Lisak R.P., Myers L.W., Panitch H.S., Rose J.W., Schiffer R.B. 1995. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology.* **45**(7), 1268–1276.
11. Fusco C., Andreone V., Coppola G., Luongo V., Guerini F., Pace E., Florio C., Pirozzi G., Lanzillo R., Ferrante P., Vivo P., Mini M., Macri M., Orefice G., Lombardi M.L. 2001. HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology.* **57**(11), 1976–1979.
12. Gross R., Healy B.C., Cepok S., Chitnis T., Khoury S.J., Hemmer B., Weiner H.L., Hafler D.A., De Jager P.L. 2010. Population structure and HLA DRB1*1501 in the response of subjects with multiple sclerosis to first-line treatments. *J. Neuroimmunol.* doi:10.1016/j.jneuroim.2010.10.038.
13. Grossman I., Avidan N., Singer C., Goldstaub D., Hayardeny L., Eyal E., Ben-Asher E., Paperna T., Pe'er I., Lancet D., Beckmann J.S., Miller A. 2007. Pharmacogenetics of glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis reveals drug-response markers. *Pharmacogenet. Genomics.* **17**(8), 657–766.
14. Алифинова В.М., Орлова Ю.Ю., Бабенко С.А., Рудко А.А., Пузырев В.П. 2006. Полиморфизм 1188 А/С гена *IL12B* у больных рассеянным склерозом в Томской области и возможности оценки эффективности иммуномодулирующей терапии. *Журн. неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. Рассеянный склероз.* **3**, 111–116.
15. McDonald W.I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H.P., Lublin F.D., McFarland H.F., Paty D.W., Polman C.H., Reingold S.C., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., Van den Noort S., Weinshenker B.Y., Wolinsky J.S. 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**(1), 121–127.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*. Ed. Nolan C. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
17. Судомоина М.А., Бойко А.Н., Демина Т.Л., Гусев Е.И., Болдырева М.Н., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Фаворова О.О. 1998. Связь рассеянного склероза в русской популяции с аллелями гена *DRB1* главного комплекса гистосовместимости. *Молекуляр. биология.* **32**(2), 291–296.
18. He B., Navikas V., Lundah J., Söderström M., Hillert J. 1995. Tumor necrosis factor alpha-308 alleles in multiple sclerosis and optic neuritis. *J. Neuroimmunol.* **63**, 143–147.
19. Судомоина М.А., Сухина Т.С., Барсова Р.М., Фаворов А.В., Шахнович Р.М., Титов Б.В., Матвеева Н.А., Рыбалкин И.Н., Власик Т.Н., Оchs M.F., Руда М.Я., Фаворова О.О. 2010. Комплексный анализ ассоциации полиморфизма генов воспаления с инфарктом миокарда. *Молекуляр. биология.* **44**(3), 463–471.
20. Макарычева О.Ю., Царева Е.Ю., Судомоина М.А., Кулакова О.Г., Быкова О.В., Гольцова Н.В., Кузенкова Л.М., Бойко А.Н., Фаворова О.О. 2010. Анализ сцепления и ассоциации аллелей генов провоспалительных цитокинов IL-6, IFNG и TNF с рассеянным склерозом с помощью теста неравно-

- весной передачи аллелей (TDT). *Молекуляр. биология*. **44**(5), 824–830.
21. Pravica V., Perrey C., Stevens A., Lee J.H., Hutchinson I.V. 2000. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. *Hum. Immunol.* **61**(9), 863–866.
 22. Marron M.P., Raffel L.J., Garchon H.J., Jacob C.O., Serrano-Rios M., Martinez Larrad M.T., Teng W.P., Park Y., Zhang Z.X., Goldstein D.R., Tao Y.W., Beaurain G., Bach J.F., Huang H.S., Luo D.F., Zeidler A., Rotter J.I., Yang M.C., Modilevsky T., Maclaren N.K., She J.X. 1997. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum. Mol. Genet.* **6**(8), 1275–1282.
 23. Sandford A.J., Pare P.D. 1997. Direct PCR of small genomic DNA fragments from serum. *Biotechniques*. **23**(5), 890–892.
 24. Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. 2005. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics*. **171**(4), 2113–2121.
 25. Yusuf S., Peto R., Lewis J., Collins R., Sleight P. 1985. Beta blockade during and after myocardial infarction: an overview of the randomized trials. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **27**(5), 335–371.
 26. Фаворова О.О., Кулакова О.Г., Бойко А.Н. 2010. Рассеянный склероз как полигенное заболевание: современное состояние проблемы. *Генетика*. **46**(3), 302–313.
 27. Barcellos L.F., Sawcer S., Ramsay P.P., Baranzini S.E., Thomson G., Briggs F., Cree B.C., Begovich A.B., Villoslada P., Montalban X., Uccelli A., Savettieri G., Lincoln R.R., DeLoa C., Haines J.L., Pericak-Vance M.A., Compston A., Hauser S.L., Oksenberg J.R. 2006. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **15**(18), 2813–2824.
 28. Simpson J., Rezaie P., Newcombe J., Cuzner M.L., Male D., Woodroffe M.N. 2000. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J. Neuroimmunol.* **108**(1–2), 192–200.