

На правах рукописи



БРАГИНА ЕЛЕНА ЮРЬЕВНА

**ФЕНОМЕН СОЧЕТАНИЯ БОЛЕЗНЕЙ:
РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В РАЗВИТИИ СИНТРОПИЙ И ДИСТРОПИЙ**

1.5.7 Генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Пузырев Валерий Павлович

Официальные оппоненты:

Рагино Юлия Игоревна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», руководитель (г. Новосибирск)

Уразова Ольга Ивановна, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий кафедрой (г. Томск)

Чурносков Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», медицинский институт, кафедра медико-биологических дисциплин, заведующий кафедрой (г. Белгород)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова» (г. Москва)

Защита состоится «___» _____ 2025 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу: г. Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Назаренко Мария Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Более 50 миллионов человек в возрасте 65 лет и старше, составляющих почти половину населения Европы, страдает одновременно двумя и более многофакторными заболеваниями (МФЗ) [Rijken et al., 2018]. В условиях недостаточности знаний о патогенезе отдельных МФЗ и причин формирования их сочетаний в ближайшие 20 лет прогнозируется неуклонный рост численности коморбидных пациентов и, соответственно, затрат ресурсов здравоохранения, направленных на их профилактику и лечение [Kingston et al., 2018; Babu, Snyder, 2023].

Последние десятилетия стали важным этапом для геномных исследований благодаря развитию высокопроизводительных технологий и колоссальному количеству получаемых данных. Результаты геномных исследований активно внедряются в клиническую практику. Рабочая группа по геномной медицине Национального института исследований генома человека отмечает значительный рост публикаций в 2022-2023 гг. по ряду тематик, связанных с использованием результатов геномных исследований в практическом здравоохранении [Manolio et al., 2022, 2023]. Тем не менее, для МФЗ и их сочетаний, представляющих собой сложные с точки зрения реализации наследственных факторов фенотипы, внедрение результатов в медицинскую практику остается нерешенной в настоящее время задачей. С одной стороны, это обстоятельство обусловлено все еще существующей ограниченностью знаний о генах, лежащих в основе МФЗ, особенностях развития, распространения и поддержания патологических фенотипов в современных популяциях человека [Пузырев, Кучер, 2011; Stepanov, 2016; Баранов, 2021]. С другой стороны, затруднено понимание интерактивной части, реализующейся через метаболомные, протеомные и другие типы взаимодействий [Menche et al., 2015]. Поэтому рациональные способы идентификации причин развития сложных с точки зрения исследований объектов, к которым относятся сочетания болезней, по-прежнему остаются актуальными.

Геном человека находится в сложных и все еще мало изученных отношениях с окружающей средой и социумом. Сложность изучения феномо-геномных отношений заключается в том, что при ограниченности генома (приблизительно 3 миллиарда пар оснований у человека) феном характеризуется огромным разнообразием, и предел его изучения зависит от того, как далеко мы можем и хотим продвинуться в его понимании [Rajgen, Erpiq, 2000]. За столетие до свершившейся «геномной революции», в 1930-ые годы выдающийся российский генетик А. С. Серебровский, обсуждая проблему органической эволюции, обозначил ее как «бесконечно-конечное противоречие» в «единстве бесконечного числа признаков и конечного числа генов» [Серебровский, 1973].

В таком неограниченном мире фенотипов можно наблюдать и выявлять связанные друг с другом признаки, в том числе, имеющие отношение к патологии. В клинике это явление лежит в основе диагностики болезней и определении тактики лечения, а устойчивые сочетания определенных патологических состояний представляют самостоятельный предмет исследования – феномен сочетания болезней.

Множественность болезней у индивида – проблема, привлекавшая внимание исследователей на протяжении длительного времени. Обозначив в 1921 году «взаимную склонность, притяжение» («attraction») двух болезней термином «синтропия», немецкие

врачи-педиатры Мейнгард Пфаундлер и Луиза фон Зехт на основе богатого клинического материала зафиксировали другое, противоположное синтропии патологическое состояние – «взаимное отталкивание» («repulsion»), несочетаемость (несовместимость, контрассоциация, диссоциация) – дистропия [Pfaundler, von Seht, 1921]. Вместе с тем случайные и «нейтральные состояния», также получили свое название – нейтропии.

Позже американским эпидемиологом Алваном Файнштейном в 1970 году был предложен термин «коморбидность» для описания «любой отдельной дополнительной клинической картины, которая существовала или может возникнуть во время клинического течения основного заболевания пациента» [Feinstein, 1970]. Предполагают, что в качестве причины фенотипических ассоциаций могут выступать генетические факторы, которые способны приводить к развитию множественных фенотипов [Пузырев, 2011, 2015; Sánchez-Valle et al., 2020; Dong et al., 2021].

В настоящее время стали предметом активных исследований отечественных научных коллективов различные аспекты развития коморбидности, в частности, касающиеся болезней кровообращения [Барбараш с соавт., 2019; Григорьева с соавт., 2019; Драпкина с соавт., 2023], аутоиммунных [Гордеев с соавт., 2014], аллергических [Мурашкин с соавт., 2020; Балаболкин с соавт., 2021], бронхо-легочных [Павлова с соавт., 2022], нейropsychических [Лебедева с соавт., 2012; Бохан с соавт., 2014] заболеваний. Активно обсуждаются вопросы практической целесообразности классификации лекарственных препаратов в зависимости от их последствий в отношении коморбидности [Белялов, 2020; 2021; 2022]. В том числе работы сосредоточены на исследовании влияния генетических факторов в развитии определенных сочетаний или несочетаний МФЗ [Карунас с соавт., 2012; Glotov et al., 2015; Бушуева с соавт., 2020; Назаренко с соавт., 2022; Понасенко с соавт., 2024], особенностях фенотипических проявлений в случае сочетания редких генетических аномалий [Vasilyeva et al., 2023].

С начала XXI века в биологии и медицине обозначился новый подход – сетевой анализ как попытка разобраться в закономерностях формирования и функционирования разного рода сетей, в том числе генетических, взаимодействие и регуляция компонентов которых определяет здоровье или болезнь [Barabasi et al., 2011; Lee, Loscalzo, 2019]. В результате такого подхода сформулированы или уточнены основные понятия, включая синтропные/дистропные болезни, дизисом, сетевая медицина, которые меняют парадигму генетики МФЗ, выявляя новые взаимоотношения между различными патологическими состояниями.

Согласно современным представлениям о связях между заболеваниями сформулировано определение синтропии как природно-видового явления сочетания двух и более патологических состояний (нозологий или синдромов) у индивидуума и его ближайших родственников, неслучайного и имеющего эволюционно-генетическую основу. Иными словами - это часть (выборка) фенома человека, представляющая собой ландшафт взаимодействующих признаков и болезней, отражающий непрерывающуюся молекулярно-генетическую причинность [Пузырев, 2002; Puzyrev et al., 2010]. В соответствии с этим определением предложена классификация генов, участвующих в развитии феномена сочетания болезней, и даны определения синтропным и дистропным генам [Пузырев, 2002; 2015]. Однако в целом имеющиеся попытки решения задач систематизации,

классификации, уяснения общих свойств, фиксирующих закономерные связи между болезнями, во всем многообразии таких сочетаний, имеют много пробелов.

Таким образом, достаточно давно описанный в клинической практике феномен сочетания болезней, с одной стороны, представляет самостоятельный интерес для исследований фундаментального характера и становится дополнительным путем выяснения этиологии и патогенеза сложных заболеваний, к изучению которого привлекаются современные методологические и концептуальные подходы. С другой стороны, описание феномена сопутствующих болезней имеет решающее значение для расширения интерпретационного горизонта клинициста и выход за пределы узких, ориентированных на конкретную болезнь, терапевтических решений.

Степень разработанности темы исследования. Методологической основой современных представлений о природе и характере взаимоотношений между заболеваниями в настоящее время являются два основных направления исследований. Одно из них состоит в разработке концепции ко-наследуемости, согласно которой многие гены могут являться общими для двух признаков или заболеваний. Классические исследования корреляций с использованием близнецовых или семейных исследований, продемонстрировали высокую фенотипическую и генетическую связь болезней метаболического синдрома [Xiang et al., 2001; Benyamin et al., 2007], аллергических заболеваний [van Beijsterveldt and Boomsma, 2007; Hopper et al., 2012]. В рамках другого направления болезни рассматриваются как следствие нарушений взаимодействий и регуляции компонентов многомерных биологических сетей [Barabasi et al., 2011; Lee, Loscalzo, 2019]. Такой холистический подход позволяет раскрыть общее генетическое происхождение многих болезней в глобальных биологических сетях [Goh et al., 2007; Rzhetsky et al., 2007; Lee et al., 2008; Zhernakova et al., 2009; Park et al., 2009; Blair et al., 2013].

Как отмечают Kabesch и Tost [2020] еще 100 лет назад впервые было замечено, что atopические заболевания, к которым относятся бронхиальная астма, аллергический ринит и atopический дерматит, встречаются в некоторых семьях и даже у одного и того же пациента чаще, чем в популяции в целом. Еще одной из особенностей клинического течения бронхиальной астмы является её распространенная коморбидность с сердечно-сосудистой патологией [Stebbins, 1973; Dogra et al., 2007; Johnson et al., 2010; Ferguson et al., 2014; Iribarren et al., 2012; Christiansen et al., 2016; Tattersall et al., 2016; Zhang et al., 2022]. У пациентов с персистирующей бронхиальной астмой наблюдаются более выраженные атеросклеротические изменения [Onufrak et al., 2007; Tattersall et al., 2022]. Повышенный уровень эозинофилов в крови, являющийся характерным признаком аллергического воспаления, связан с риском развития сердечной недостаточности и инсульта, вызывает коронарную нестабильность и ухудшает состояние после острого инфаркта миокарда [Niccoli et al., 2015; Pongdee et al., 2022]. Сопутствующие бронхиальной астме болезни, как правило, утяжеляют её течение [Zhang et al., 2009; Holguin et al., 2011], затрудняют лечение [van Gent et al., 2007] и снижают качество жизни пациентов [Peters et al., 2018].

Согласно имеющимся данным подверженность сочетанному развитию бронхиальной астмы, как с аллергическими болезнями, так и болезнями неаллергической природы обусловлена, в том числе генетическими факторами [Baççioğlu Kavut et al., 2012; Davidson

et al., 2019; Kabesch, Tost, 2020]. В результате полногеномных исследований установлено, что гены, биологическая функция которых заключается в клеточной активации, продукции цитокинов, регуляции иммунного ответа и воспаления, являются наиболее значимыми для инициации развития нескольких аллергических болезней у пациента [Ferreira et al., 2014; Zhu et al. 2018]. Классические механизмы патогенеза бронхиальной астмы оказались частью ключевых процессов нарушения функционирования сердца и сосудов, поэтому среди обсуждаемых причин коморбидности астмы и сердечно-сосудистых болезней рассматривают гены, участвующие в важных для этих заболеваний разнообразных физиологических и патофизиологических реакциях [Madeo et al., 2009; Russo et al., 2017; Kim et al., 2017; Савельева с соавт., 2018; Yu et al., 2019; Yan et al., 2020].

В меньшей степени изучена антагонистическая природа заболеваний, или дистропия, выражающаяся редким сочетанием, или даже исключением их совместного развития. Ряд исследований свидетельствует о возможной дистропии аллергических болезней и туберкулеза [Яблоков, 1968; von Hertzen et al., 1999; Mungan et al., 2001; Obihara et al., 2005; 2007; Cernat et al., 2010; Fekih et al., 2010]. В основе такого рода фенотипического компромисса может лежать недостаточность иммуностимулирующего микробного мира, который имеет решающее значение для создания компетентной конфигурации иммунной системы, препятствующей развитию аллергических заболеваний [Strachan, 2000; Ege et al., 2011; Illi et al., 2012]. Между тем для дистропных заболеваний, в частности аллергических и инфекционных, несмотря на их фенотипическую дистанцированность, также идентифицированы общие гены, которые свидетельствуют о неслучайном характере взаимоотношений между ними [Фрейдин с соавт., 2015; Baranova et al., 2022].

Таким образом, представляется важным дальнейшее изучение феномена сочетания болезней, углубление анализа накапливающегося фактического материала, основанного на клинических и генетических данных, а также концептуализация исследований в этой области.

Целью настоящей работы является исследование феномо-геномных отношений в развитии многофакторных синтропных и дистропных болезней.

Задачи исследования:

1. Оценить *in silico* молекулярно-генетические взаимодействия в ассоциативных сетях широко распространенных заболеваний.
2. Провести поиск генов, ассоциированных с синтропией «бронхиальная астма и гипертоническая болезнь» и дистропией «бронхиальная астма и туберкулез». Охарактеризовать наследственную компоненту синтропии аллергических заболеваний относительно общности и специфичности, ассоциированных с ними генов.
3. Исследовать ассоциации полиморфных вариантов выявленных генов для синтропных и дистропных пар болезней (туберкулез, бронхиальная астма, атопический дерматит, аллергический ринит, гипертоническая болезнь) в группах пациентов с изолированными формами заболеваний в сравнении с коморбидными пациентами.
4. Изучить вариабельность экспрессии ассоциированных с бронхиальной астмой и туберкулезом генов в зависимости от генотипа индивида и стимуляции сигнальных путей, связанных с антибактериальным и аллергическим ответом, воспалительной реакцией.

5. Обозначить «герменевтическое поле» основных концепций и взглядов, эффективных в анализе структурных элементов и смыслов феномена сочетания болезней.

Научная новизна исследования. В результате *in silico* исследования ассоциативных генетических сетей установлены общие гены/белки, которые могут способствовать развитию коморбидности широкого спектра заболеваний многофакторной природы. Функциональный контекст выявленных генов/белков, прежде всего, лежит в области иммунного ответа и хронического воспаления.

Впервые показаны особенности патогенетики сочетания (синтропии) и несочетания (дистропии) ряда широко распространенных многофакторных болезней человека, среди которых заболевания органов дыхания (бронхиальная астма, аллергический ринит, туберкулез легких), кожи (атопический дерматит) и сердечно-сосудистой системы (гипертоническая болезнь).

Впервые показано, что развитие коморбидности аллергических заболеваний (бронхиальная астма, аллергический ринит, atopический дерматит) у пациента обусловлено высокой долей участия генов (52,9%), не связанных с развитием соответствующих изолированных патологий. В результате анализа полногеномных данных определены гены (*AL590648.3/BATF3* и *HLA-DQB1*), ассоциированные с развитием синтропии бронхиальной астмы с atopическим дерматитом и аллергическим ринитом. Впервые доказано, что среди наиболее важных генов, связанных с развитием коморбидности бронхиальной астмы и гипертонической болезни, представлены гены *ANG/RNASE4*, *LOC105376244/TLR4*, *ABTB2/CAT*, продукты которых вовлечены в развитие окислительного стресса, воспаления и неоваскуляризации, патогенетически важных процессов для функционирования эндотелия.

Впервые идентифицированы особенности развития коморбидности бронхиальной астмы и гипертонической болезни в зависимости от последовательности манифестации каждого из заболеваний. Установлено, что полиморфные локусы (rs769214, rs11032700, rs11032699, rs484214, rs480575), регулирующие экспрессию гена *CAT* в различных тканях, ассоциированы с развитием гипертонической болезни на фоне бронхиальной астмы, а риск развития бронхиальной астмы на фоне гипертонической болезни связан с регуляторным вариантом экспрессии генов *RNASE4* и *ANG* (rs1010461).

Сделано предположение, что риск развития синтропных болезней и составляющих их «отдельностей» (изолированных заболеваний) различается. Это объясняется особенностями наследственной структуры подверженности к синтропии и изолированно существующим болезням. В этом случае синтропии и изолированные болезни, составляющие синтропию, могут претендовать на статус самостоятельных нозологических единиц.

Впервые установлены гены/белки, значимые для фенотипической дистанцированности бронхиальной астмы и туберкулеза, которые тесно связаны, в первую очередь, с регуляцией процессов иммунной системы, активацией Т-лимфоцитов, ответом на бактериальные и другие стимулы. Показано, что регуляторный эффект на генную экспрессию отдельных полиморфных вариантов, ассоциированных с развитием как atopической бронхиальной астмы, так и туберкулеза легких, в частности rs2239704, изменяется в зависимости от условий стимуляции и генотипа индивида.

В целом, результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, дополняют знания о генах подверженности МФЗ в контексте концепции синтропных и дистропных болезней.

Теоретическая и практическая значимость. Использование в работе современных экспериментальных методов и концептуальных подходов позволило установить генетические особенности коморбидных фенотипов в сравнении с их изолированными формами («отдельностями»). Этому способствовала наша приверженность известному тезису И. Канта: «Разум помещает опыт в систему принципов, в результате чего генерируется знание» [Кант, 2020]. В настоящем исследовании «чувственный опыт», представляющий полученные результаты феномо-геномных отношений разных МФЗ и сочетаний между ними, помещенный в «герменевтическое поле» концепций и принципов, включая принципы клинической генетики В. МакКьюсика, общей патологии И. В. Давыдовского, гипотезу «условных тропизмов» С. Н. Давиденкова, а также понятий «синдром», «синтропия» и «дистропия», «плейотропизм» генов, позволили сформулировать основные положения и выводы диссертационной работы.

Практическое применение полученных результатов заключается в развитии представления о патогенетике МФЗ. Кроме того, выявленная генетическая специфичность коморбидных фенотипов по сравнению с формирующими их изолированными болезнями предоставляет возможность использования молекулярно-генетической информации для фенотипирования групп населения с целью оценки риска развития изолированных или сочетанных патологических состояний. Идентификация молекулярных механизмов развития сопутствующих болезней в дополнение к основному диагнозу пациента позволяет по-новому взглянуть на классификацию болезней, прогноз и предоставляет возможность разработки профилактических мероприятий до начала клинических проявлений сопутствующей патологии. Анализ особенностей формирования феномена сочетания болезней имеет первостепенную практическую значимость, так как исследование выполнено для распространенных патологических состояний, которые относятся к социально-значимым в современном обществе заболеваниям.

Результаты исследования дополнили учебные программы для студентов кафедры медицинской генетики ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Новые данные о роли генетических факторов в развитии сопутствующих заболеваний, полученные в ходе исследования, используются в рамках подготовки кадров высшей квалификации в ординатуре по специальностям «Лабораторная генетика» и «Генетика».

Методология и методы исследования. Для решения задач диссертационного исследования использованы (1) биоинформатические методы для идентификации генов синтропных и дистропных болезней, включая реконструкцию и анализ ассоциативных генных сетей, поиск лекарственных мишеней и побочных эффектов лекарственных препаратов, идентификацию регуляторных SNPs; (2) молекулярно-генетические методы, включающие генотипирование SNPs с помощью ПЦР-ПДРФ анализа, реал-тайм ПЦР, анализ кривых плавления с высоким разрешением, мультиплексное генотипирование с помощью масс спектрометрии MALDI TOF, а также полногеномное генотипирование на платформе Illumina 610-Quad; (3) функциональная оценка полиморфных вариантов генов в зависимости от различных стимулов, вызывающих иммунный ответ, в краткосрочных культурах мононуклеарных клеток; (4) общепринятые статистические методы.

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 № 323-ФЗ. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 2 от 26.05.2017 г.).

Положения, выносимые на защиту:

1. Генетический компонент, контролирующий иммунный ответ и воспаление, вносит вклад в развитие не только аллергических, аутоиммунных и инфекционных, но и других болезней, включая сердечно-сосудистые, нейродегенеративные и метаболические заболевания. Вместе с тем по спектру общих и специфических генов, выявленных в ассоциативных генных сетях, болезни, связанные с нарушениями иммунологической реактивности, более близки между собой, однако существенно удалены относительно сердечно-сосудистых болезней.
2. Конечная структура фенотипа аллергических заболеваний зависит от генетических факторов подверженности, различающихся для изолированных и синтропных состояний. Функциональная сфера компетенции генов, ассоциированных с развитием коморбидных клинических проявлений бронхиальной астмы и аллергического ринита/атопического дерматита, главным образом, связана с нарушением эпидермального барьера, а генов подверженности соответствующим изолированным аллергическим заболеваниям - с активацией иммунной системы и воспаления.
3. В развитие синтропии «бронхиальная астма и гипертоническая болезнь» вовлечены гены, функции которых затрагивают процессы воспаления, окислительного стресса и неоваскуляризации. Структура ассоциаций полиморфных вариантов такой синтропии различается в зависимости от дебюта составляющих её заболеваний (гипертоническая болезнь или бронхиальная астма).
4. Дистропия «бронхиальная астма и туберкулез» подобно другим диаметральному болезням относится к биологическому парадоксу, одно из объяснений которого заключается в участии общих и специфических генов, вовлеченных в патогенетику двух болезней, которые образуют сеть взаимодействий, регулирующих баланс Th1/Th2 типов иммунного ответа.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обеспечивается достаточным для исследования объемом выборок, использованием широкого спектра методов молекулярно-генетического анализа, а также биоинформатических алгоритмов и общепринятых в биологии и медицине статистических приемов обработки данных.

Основные научные результаты доложены на международных и всероссийских конференциях и конгрессах: IX всероссийская научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика» (18-20 апреля 2017 г., Москва); XI научная конференция «Генетика человека и патология» (27-30 ноября 2017 г., Томск); XXV межрегиональная научно-практическая конференция «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (19-20 апреля 2018 г., Новосибирск);

European Human Genetics Conference (16-19 июня, 2018 г., Милан (Италия)); V международная научно-практическая конференция «Современные биотехнологии для науки и практики», приуроченная к Международному Дню ДНК (25-26 апреля 2018 г., Санкт-Петербург); международный научный конгресс «Генетика XXI века», посвященный 50-летию ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» и 50-летию медико-генетической службы России, (25-28 мая 2019 г., Москва); международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (18-22 июня 2019 г., Санкт-Петербург); XII научная конференция «Генетика человека и патология: Актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (20-22 ноября 2019 г., Томск); IX съезд Российского общества медицинских генетиков: международный конгресс с ассоциированными мероприятиями (30 июня - 2 июля 2021 г., Москва); международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика» (09-11 ноября 2021 г., Москва); симпозиум «Генетические основы мультифакториальной патологии» в рамках международной научно-практической конференции «Медицинская наука в эру цифровой трансформации» (10 декабря 2021 г., Курск); European Human Genetics Conference (28-31 августа 2021 г., онлайн-конференция), всероссийская конференция «Оптимальная медикаментозная терапия в кардиологии» (11-13 ноября 2021 г., Санкт-Петербург); конференция «Генетические ресурсы и генетические технологии для развития северных территорий» (21-22 декабря 2021 г.; онлайн-конференция); 13-я международная мультиконференция «Биоинформатика регуляции генома и структурная/системная биология» (4-8 июля 2022 г., Новосибирск); XXX Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», симпозиум «Традиции и инновации в диагностике и терапии нервно-психических и психосоматических расстройств» (13 апреля 2023 г., гибридный формат); XIV международный конгресс «Кардиология на перекрестке наук» (23-24 мая 2024 г., гибридный формат); 14-я международная мультиконференция «Биоинформатика регуляции генома и структурная/системная биология» (5-10 августа 2024 г., Новосибирск).

Работа выполнена в рамках финансовой поддержки государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 075-00603-19-00 «Интеграция геномных и эпигеномных подходов в изучении патогенетики коморбидных многофакторных болезней человека» (2013-2021 гг.)), гранта РФФИ № 15-04-05852 «Генетические факторы коморбидности многофакторных болезней человека» (2015-2017 гг.), гранта РНФ № 15-15-00074 «Генетические факторы подверженности различным формам туберкулезной инфекции (2015-2017 гг.), комплексной программы фундаментальных исследований Сибирского отделения РАН № 0550-2018-0003 «Реконструкция и анализ генных сетей коморбидных заболеваний» блок проекта «Реконструкция, компьютерный анализ и моделирование структурно-функциональной организации биомедицински значимых генных сетей» (2018-2020 гг.).

Публикации. Результаты диссертационного исследования обнародованы в 51 научной публикации из них 23 статьи в журналах, рецензируемых в РИНЦ /WOS /Scopus, в том числе в изданиях, рекомендованных ВАК РФ; 2 – в сборниках статей, входящих в РИНЦ; 26 тезисов региональных, всероссийских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, пяти глав, четыре из которых содержат результаты собственных исследований, заключения, выводов, списка

сокращений, списка литературы и приложений. Полный объем диссертации составляет 346 страниц, включая 30 рисунков, 43 таблицы. Библиографический список литературы включает 657 источников, из них 85 представлены отечественными и 552 зарубежными публикациями, 20 – источниками Интернет-ресурсов, находящихся в открытом доступе.

Личный вклад автора. Лично автором сформулированы цели и задачи, осуществлен выбор методов исследования, в значительной степени самостоятельно проведена обработка экспериментального и статистического материала. Автор лично организовывала все этапы проведения исследования, интерпретировала полученные данные, основные экспериментальные работы проводила самостоятельно. Все публикации по теме диссертационной работы подготовлены с личным участием и определяющим вкладом автора. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. Работа выполнена в лаборатории популяционной генетики научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ (зав. лабораторией – доктор мед. наук М. С. Назаренко). Все экспериментальные работы проведены на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ (руководитель – канд. мед. наук Н. А. Скрыбин). Исследование выполнено с использованием ресурсов коллекции «Биобанк населения Северной Евразии» научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ (руководитель – доктор биол. наук В. Н. Харьков).

1. СТРУКТУРА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ПАТОГЕНЕТИКЕ ЧАСТЫХ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

1.1. Материал и методы исследования

Оценка молекулярных связей выполнена для 22 распространенных многофакторных патологических состояний/болезней, классифицированных в категориях биомедицинских терминов MeSH (Medical Subject Headings) на следующие основные группы: психические расстройства (болезнь Альцгеймера, шизофрения), сердечно-сосудистые заболевания (артериальная гипертензия, атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром), расстройства питания и заболевания метаболической системы (ожирение, сахарный диабет, остеопороз, целиакия, гиперлипидемия), заболевания дыхательных путей (бронхиальная астма, туберкулез легких, хроническая обструктивная болезнь легких, ринит), заболевания пищеварительной системы (болезнь Крона), заболевания кожи и соединительной ткани (псориаз, дерматит), патологические состояния, признаки и симптомы (потеря массы тела, фиброз), заболевания эндокринной системы (аутоиммунный тиреоидит).

Для реконструкции ассоциативных генных сетей исследуемых 22-х распространенных патологий, использовали систему ANDSystem, разработанную в ИЦиГ СО РАН [Ivanisenko et al., 2015]. Молекулярно-генетическую связь между ними оценивали с помощью общих/специфических белков, генов, болезней, взаимодействий, метаболитов и путей, находящихся в окружении каждой из рассматриваемых патологий. В качестве меры коморбидности, оценивающей «близость» между двумя заболеваниями по общности/специфичности белков использовали два измерения – относительный риск их совместного развития (RR) и Фи-корреляция для бинарных переменных [Gomez-Cabrero et al., 2016]. Для обобщающего представления о связи между рассматриваемыми заболеваниями использовали кластерный анализ по методу Уорда и многомерное шкалирование [Сошникова и соавт., 1999], основанные на расчете двух коэффициентов

корреляции, которые были предложены для оценки коморбидности между патологиями. Статистические процедуры выполнены в программе STATISTICA версия 10.0.

1.2. Результаты и обсуждение

Количество компонентов, включая белки, гены, метаболиты, пути, заболевания, находящихся в окружении ассоциативных сетей для каждого из 22-х выбранных для исследования заболеваний различалось. Максимальное количество белков ($n = 723$) регистрируется в ассоциативной сети болезни Альцгеймера, минимальное ($n = 42$) – связано с аутоиммунным тиреоидитом (Рисунок 1).

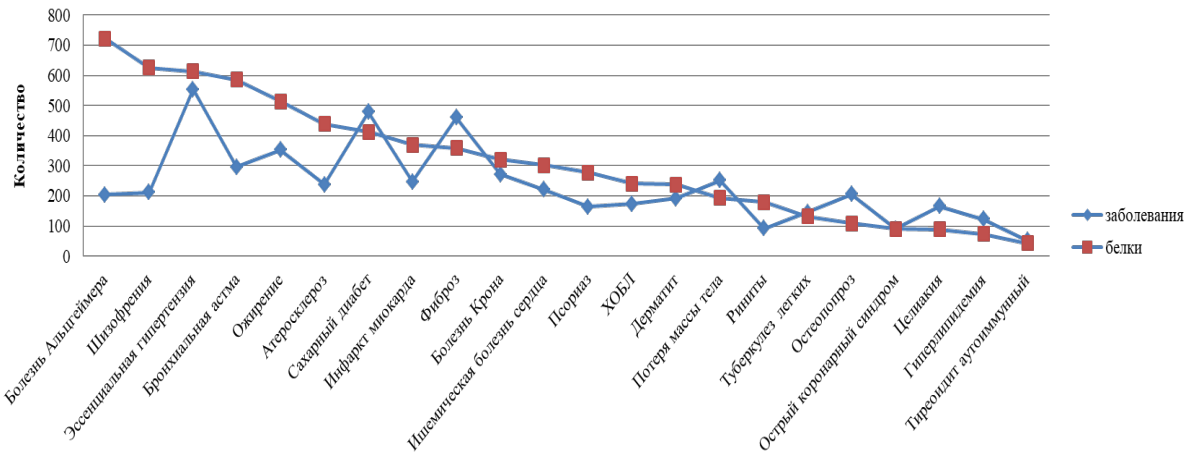


Рисунок 1 – Ранжирование 22-х анализируемых патологий по количеству ассоциированных с ними в ассоциативных сетях белков и заболеваний

При этом компоненты ассоциативных сетей болезней также различаются по числу взаимодействий между ними. Количество взаимодействий, которые образуют компоненты в ассоциативной сети болезни, многократно превышает количество генов/белков. Наибольшее количество взаимодействий характерно для компонентов ассоциативной сети артериальной гипертензии ($n = 4582$). В этой же ассоциативной сети регистрируется максимальное количество заболеваний ($n = 553$), что вероятно обусловлено рисковой значимостью артериальной гипертензии для развития других болезней (Рисунок 1). Минимальное количество взаимодействий ($n = 181$) зафиксировано в ассоциативной сети аутоиммунного тиреоидита. Стоит отметить, что в этой сети меньше всего молекулярных объектов по сравнению с другими сетями, что вероятно связано меньшей изученностью аутоиммунного тиреоидита по сравнению с другими рассматриваемыми заболеваниями.

Обращает внимание, что, несмотря на большое количество белков в ассоциативных сетях для болезни Альцгеймера и шизофрении (723 и 626 соответственно), с ними связано относительно небольшое количество заболеваний (204 и 211 соответственно), подобная ситуация характерна для ассоциативной сети бронхиальной астмы – 586 белков, 1923 взаимодействия и 296 заболеваний (Таблица 1). Это свидетельствует об ограниченном круге заболеваний, в основе которых могут лежать гены, связанные с нейродегенеративными процессами (в случае болезни Альцгеймера и шизофрении) и аллергическими (в случае бронхиальной астмы).

Количество компонентов в ассоциативных сетях 22-х выбранных для исследования заболеваний коррелирует между собой в разной степени (Таблица 1). Количество

белков/генов в меньшей степени коррелирует с количеством заболеваний ($0,72$ ($p = 1,4 \times 10^{-4}$) / $0,59$ ($p = 0,004$)) по сравнению с другими объектами в ассоциативных сетях.

Таблица 1 – Корреляции количества компонентов в ассоциативных сетях исследуемых заболеваний

Компоненты сети	белки	гены	метаболиты	пути	заболевания	взаимодействия
белки	-	0,93	0,84	0,92	0,72	0,90
гены	$7,8 \times 10^{-10}$	-	0,66	0,77	0,59	0,76
метаболиты	$3,0 \times 10^{-6}$	0,002	-	0,92	0,81	0,97
пути	$1,4 \times 10^{-9}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-8}$	-	0,82	0,90
заболевания	$1,4 \times 10^{-4}$	0,004	$1,4 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-6}$	-	0,82
взаимодействия	$8,0 \times 10^{-9}$	$3,4 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-12}$	$8,3 \times 10^{-9}$	$3,3 \times 10^{-6}$	-

Примечание. Над диагональю приведены значения коэффициента корреляции между разными компонентами сетей, под диагональю – достигнутый уровень значимости.

Проведенный анализ общих и специфических белков/генов 22-х патологий свидетельствует об относительной молекулярно-генетической близости между ними, которая соответствует эпидемиологическим данным по коморбидности. Так, для сердечно-сосудистых заболеваний продемонстрировано высокое значение RR для пар болезней «Острый коронарный синдром – Гиперлипидемия», который составил 37,88, «Острый коронарный синдром – Инфаркт миокарда» – 37,99, «Острый коронарный синдром – Атеросклероз» – 23,1. На рисунке 2 представлены дендрограммы кластеризации 22-х болезней, для создания которых использованы разные измерения (RR и Фи-коэффициент).

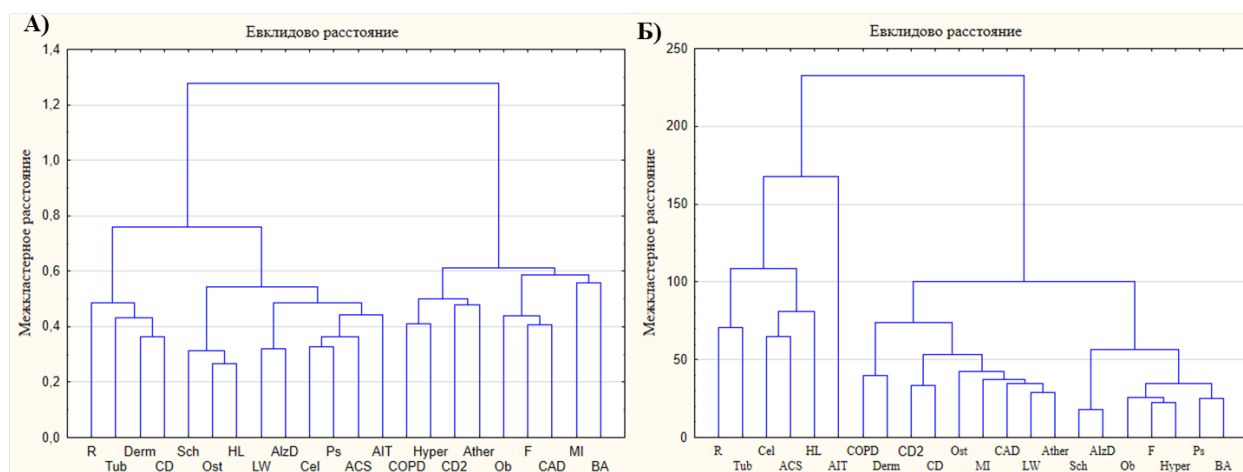


Рисунок 2 – Дендрограмма, представляющая результаты кластеризации 22-х болезней, построенная с помощью метода Уорда на основе значений: А) Фи-корреляции, Б) RR. На нижней оси приведены сокращенные названия заболеваний.

Согласно результатам кластеризации, отдельный кластер образуют сердечно-сосудистые заболевания (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда) и факторы риска их прогрессии (артериальная гипертензия, фиброз, ожирение), болезни ЦНС (болезнь Альцгеймера и шизофрения) (Рисунок 2). Обращает на себя внимание генетическая удаленность бронхиальной астмы и туберкулеза, измеренная как RR, так и Фи-коэффициентами, эти два дистропных в фенотипическом проявлении заболевания

дистанцированы согласно оценке общности и специфичности, ассоциированных с ними генов.

В результате использования многомерного шкалирования также выявлены некоторые закономерности. С одной стороны, очевидна специфичность категорий рассматриваемых заболеваний согласно имеющимся данным об их патогенезе и известным клиническим проявлениям (Рисунок 3А). С другой стороны, очевидно, что большинство болезней сгруппировано к центру, что свидетельствует о большой части общей наследственной компоненты между исследуемыми МФЗ разной этиологии (Рисунок 3В).

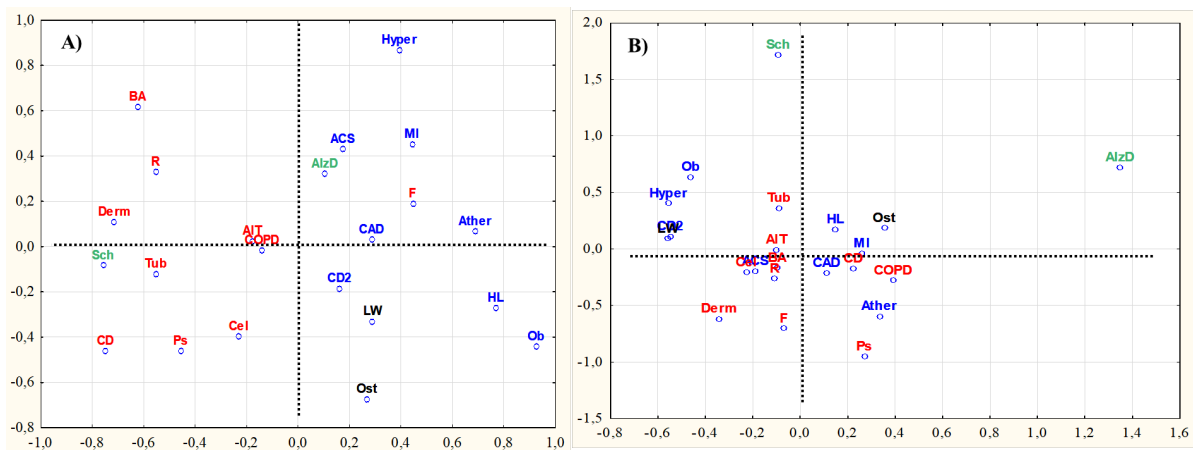


Рисунок 3 – Граф сходства 22 исследуемых болезней, построенный методом многомерного шкалирования с использованием коэффициента RR, в координатах А) измерения 2 и измерения 4; В) в координатах измерения 1 и измерения 3. Синим цветом выделены сердечно-сосудистые заболевания и их факторы риска, красным – болезни, связанные с нарушением функционирования иммунной системы, зеленым – болезни ЦНС, черным – другие.

Сравнительная оценка списков генов из ассоциативных сетей для всех 22-х патологических состояний позволила установить, что 1207 генов, составляющих 15,7 % от всех генов в исследуемых ассоциативных сетях, вовлечены в более чем одно заболевание. Биологическая интерпретация функции этих генов показала их сверхпредставленность для функционирования иммунной системы с помощью сигналинга различных цитокинов (R-HSA-449147: $\text{Log}(q\text{-value}) = -22,94$, M196: $\text{Log}(q\text{-value}) = -13,31$), регуляции воспалительного ответа (GO:0050727: $\text{Log}(q\text{-value}) = -18,77$), позитивной регуляции иммунного эффекторного процесса (GO:0002699: $\text{Log}(q\text{-value}) = -15,38$), а также для канонического пути белков-активаторов-1 (AP-1) (M167: $\text{Log}(q\text{-value}) = -19,82$), которые представляет собой группу транскрипционных факторов, выполняющих важные функции иммунной системы, включая активацию и дифференцировку, анергию и истощение Т-клеток. Таким образом, генетический контроль воспалительной и иммунной компоненты характерен для исследуемого спектра заболеваний и лежит в основе наблюдаемого распределения.

В результате проведенного анализа ассоциативных генных сетей распространенных МФЗ установлены особенности их структуры в зависимости от компонентов сети, включая белки, гены, метаболиты, пути, заболевания и взаимодействий между ними. Анализ общих и специфических белков/генов, ассоциированных с изученными заболеваниями, позволил

оценить связи между этими заболеваниями относительно друг друга на молекулярном уровне. Установлено, что большинство исследуемых патогенетически различающихся болезней имеет общий генетический компонент, сфера компетенции которого преимущественно связана с иммунным ответом и воспалением.

2. ПОИСК ОБЩИХ И СПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ ПРИ ИЗОЛИРОВАННОМ ФЕНОТИПЕ И КОМОРБИДНОСТИ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

2.1. Материал и методы исследования

Для выполнения одной из задач настоящего исследования привлечены данные об SNPs и генах, ассоциированных с изолированными и коморбидными фенотипами бронхиальной астмы, полученные в работе Johansson с соавт. [2019]. Используя эти данные, выполнена оценка общности/специфичности генов, ассоциированных с синтропией аллергических заболеваний, а также с развитием отдельных (изолированных) состояний, включая бронхиальную астму и аллергический ринит/атопический дерматит.

Для оценки молекулярно-генетической близости между синтропными и изолированными аллергическими заболеваниями списки общих/специфических генов для разных фенотипов сравнили между собой, используя индекс Жаккара (JI) и Евклидово расстояние.

Для анализа ассоциаций SNPs, выбранных на основании исследования Johansson с соавт. [2019], с синтропией бронхиальной астмы/аллергического ринита/атопического дерматита и составляющих её изолированных заболеваний, использованы данные о генотипах, полученные в результате полногеномного генотипирования образцов ДНК индивидов семейной выборки г. Томска и г. Иркутска на микрочипе Illumina 610-Quad BeadChip. Полногеномное генотипирование выполнено в рамках консорциума GABRIEL, посвященного исследованию генетических и средовых факторов развития бронхиальной астмы в Национальном центре генотипирования (Centre National de Génotypage) в г. Эври, Франция.

Семьи (n = 196), включенные в анализ, зарегистрированы по пробандам – детям, больным бронхиальной астмой. Суммарно обследовано 804 индивида, у 151 из них зарегистрирован атопический дерматит, у 244 - аллергический ринит, а у 194 - установлено сочетание бронхиальной астмы с атопическим дерматитом и/или аллергическим ринитом.

Для анализа ассоциаций SNPs в связи с развитием синтропии и изолированных аллергических заболеваний в семейной выборке использовали тест неравновесной передачи аллелей (TDT). Расчеты проводили в программе PLINK v.1.07 [Purcell et al., 2007].

Для биологической интерпретации общих/специфических генов, связанных с разными аллергическими фенотипами, выполнена оценка представленности функциональных групп генов интереса в терминах генной онтологии (GO) с помощью онлайн ресурса Metascape [Zhou et al., 2019].

2.2. Результаты и обсуждение

Гены-кандидаты синтропии «бронхиальная астма и аллергический ринит/атопический дерматит». С синтропией бронхиальной астмы с аллергическим ринитом/атопическим дерматитом ассоциировано 276 генов, что составляет 53,1 % от всех генов, ассоциированных как с синтропией, так и составляющими ее изолированными

фенотипами. Практически в два раза меньше генов ассоциировано с развитием изолированной бронхиальной астмы ($n = 111/21,3\%$) и аллергическим ринитом/атопическим дерматитом ($n = 133/25,6\%$) соответственно (Рисунок 4А).

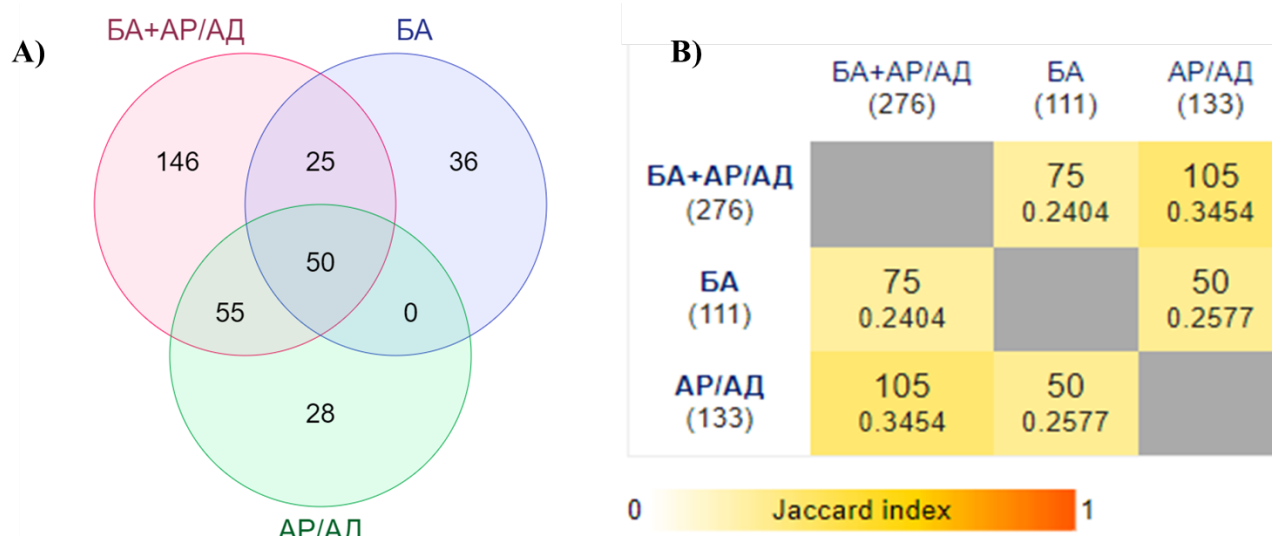


Рисунок 4 – А) Общность и специфичность генов, ассоциированных с коморбидным и изолированным фенотипами бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний по данным GWAS [Johansson et al., 2019]; В) в верхней строке каждой ячейки представлено количество общих (пересекающихся) генов между рассматриваемыми заболеваниями, а в нижней строке приведен JI для ассоциированных наборов генов.

С генетической точки зрения, сочетание бронхиальной астмы с другими болезнями, по крайней мере, аллергическими, отличается относительно изолированной бронхиальной астмы, несмотря на известное сходство патогенеза аллергических заболеваний. Индекс Жаккара (Рисунок 4В), отражающий сходство между сравниваемыми генами, показывает, что гены изолированной бронхиальной астмы в меньшей степени пересекаются с генами подверженности синтропии аллергических заболеваний ($JI = 0,2404$), чем гены подверженности аллергическому риниту/атопическому дерматиту ($JI = 0,3454$).

Примечательно, что большинство генов ($n = 146$, $52,9\%$) являются специфическими для развития синтропии бронхиальной астмы с аллергическим ринитом/атопическим дерматитом (Рисунок 4). Наименьшее число генов ($n = 25$, $9,1\%$), ассоциированных с коморбидным фенотипом, пересекается с генами изолированной бронхиальной астмы, и только $18,1\%$ ($n = 50$) генов являются общими для всех трех рассматриваемых фенотипов (БА, АР/АД, БА + АР/АД).

Категории, которыми были обогащены специфические гены исследуемых фенотипов, в целом, продемонстрировали некоторые особенности. Наиболее значимый процесс, в который вовлечены специфические гены синтропии аллергических заболеваний, связаны с функцией и развитием эпидермиса, являющегося защитным барьером на этапе проникновения аллергенов ((GO:0031424: кератинизация) $\text{Log}(q\text{-value}) = -38,49$).

Специфические гены изолированной бронхиальной астмы максимально представлены в категории дифференцировки В-лимфоцитов, соответствующей уже известным функциональным особенностям аллергической бронхиальной астмы ((GO:0030183: дифференцировка В-лимфоцитов) $\text{Log}(q\text{-value}) = -0,52$). Наиболее значимые термины GO

описывают функцию специфических генов аллергического ринита/атопического дерматита в категории, связанной с нарушением передачи сигналов ядерного фактора κB ((GO:0007249: каноническая передача сигнала NF- κB) $\text{Log}(q\text{-value}) = -0,48$).

Общие (пересекающиеся) гены всех рассматриваемых патологических фенотипов значительно обогащены в категориях, имеющих отношение к активации противовоспалительного ответа и иммунных реакций ((GO:0045321: активация лейкоцитов) $\text{Log}(q\text{-value}) = -12,21$; (GO:0001819: позитивная регуляция продукции цитокинов) $\text{Log}(q\text{-value}) = -8,58$).

Несмотря на общие закономерности патогенеза аллергических заболеваний, как показало настоящее исследование, в структуре генетической предрасположенности выделяется как общий, так и специфический компонент для изолированных и синтропных фенотипов аллергических болезней. Бронхиальная астма в сочетании с аллергическим ринитом/атопическим дерматитом характеризуется более выраженной «генетической специфичностью». По совокупности ассоциированных генетических вариантов и их функциональной интерпретации синтропия бронхиальной астмы с аллергическим ринитом/атопическим дерматитом и изолированные фенотипы (аллергический ринит/атопический дерматит/бронхиальная астма) являются отдельными заболеваниями, в развитии которых задействованы разные молекулярные пути.

Оценка ассоциаций SNPs с развитием аллергических заболеваний. В результате анализа SNPs в семейной выборке пациентов с аллергическими заболеваниями (Таблица 2) выявлено, что с развитием бронхиальной астмы ассоциированы 3 полиморфизма, один из которых (rs1837253) локализован в межгенном регионе *AC010395.1/TSLP*, второй вариант (rs11742240) затрагивает, в том числе ген рецептора к интерлейкину 7 (*IL7R/AC112204.3*). Вблизи третьего варианта (rs1555926) расположен ген *ZNF217*, кодирующий белок цинковых пальцев 217, который выполняет онкогенные функции при различных видах рака.

Из ассоциированных с бронхиальной астмой трех вариантов наиболее объяснима ассоциация полиморфного варианта rs1837253, затрагивающего, в том числе регуляцию гена *TSLP*, который наряду с интерлейкинами IL-25 и IL-33, определяет особый вариант активации антигенпрезентирующих дендритных клеток, направляющих дифференцировку Т-хелперов, активированных аллергеном по пути проаллергических Th2 и Th9 [Симбирцев, 2021]. С развитием атопического дерматита ассоциирован единственный вариант rs2197415 (Таблица 2), локализованный в регионе генов *AC044784.1/LINC00709*, один из которых является геном длинной некодирующей РНК, ассоциированный, по данным GWAS, с широким кругом заболеваний и признаков, включая аллергические, аутоиммунные, онкологические и другие.

Примечательно, но с развитием бронхиальной астмы коморбидной с аллергическим ринитом, а также бронхиальной астмой с аллергическим ринитом и атопическим дерматитом, ассоциированы другие SNPs, в частности, rs906363 (*AL590648.3/BATF3*) и rs7755224, который относится к кластеру генов гистосовместимости на хромосоме 6p21.32. В целом, результаты этой части исследования свидетельствуют о «генетической специфичности» синтропий аллергических заболеваний относительно их изолированных фенотипов.

Таблица 2 – Ассоциации SNPs с изолированными и коморбидными аллергическими заболеваниями в семейной когорте

ID SNP (A1/A2*)	БА	АД	БА+АД	БА+АР	БА+АД+АР
rs906363 (C/T)	1,2 (0,4349)	0,56 (0,6374)	0,57 (0,1306)	0,46 (0,0086)	0,5 (0,0061)
N (%)**	22 (54,5/45,5)	14 (35,7/64,3)	22 (36,4/63,6)	51 (31,4/68,6)	63 (33,3/66,7)
rs11742240 (T/G)	2,0 (0,0325)	0,7 (0,2971)	0,77 (0,3865)	1,15 (1,0)	1,02 (0,7277)
N (%)**	33 (66,7/33,3)	17 (41,2/58,8)	39 (43,6/56,4)	73 (53,4/46,6)	95 (50,5/49,5)
rs1837253 (T/C)	2,2 (0,0295)	1,3 (0,2733)	0,79 (0,7815)	1,02 (0,7172)	0,98 (0,8711)
N (%)**	32 (68,7/31,3)	23 (56,5/43,5)	43 (44,2/55,8)	93 (50,5/49,5)	117 (38,9/61,1)
rs7755224 (G/A)	0,57 (0,0771)	1,0 (0,4142)	0,71 (0,223)	0,68 (0,1797)	0,64 (0,0455)
N (%)**	22 (36,4/63,6)	4 (50,0/50,0)	29 (41,4/58,6)	37 (40,5/59,5)	54 (38,9/61,1)
rs2197415 (T/G)	0,95 (0,2786)	2,5 (0,0285)	1,0 (0,6617)	0,92 (0,715)	0,97 (1,0)
N (%)**	41 (48,8/51,2)	28 (71,4/28,6)	38 (50,0/50,0)	96 (47,9/52,1)	116 (49,1/50,9)
rs1555926 (C/T)	1,9 (0,0394)	1,6 (0,6547)	2,2 (0,0641)	1,09 (0,9165)	1,15 (0,8514)
N (%)**	29 (65,5/34,5)	13 (61,5/38,5)	32 (68,8/31,3)	71 (52,1/47,9)	88 (53,4/46,6)

Примечание. A1/A2* – альтернативный/референсный аллель. В ячейках приведены значения OR_{TDT} (p-значение) для альтернативного аллеля в отношении развития заболевания. N (%)** - приведено количество аллелей, унаследованных больными детьми от гетерозиготных родителей, в скобках указана частота трансмиссии альтернативного/референсного аллеля от гетерозиготных родителей больным детям.

3. ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ СИНТРОПИИ «БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ»

3.1. Материалы и методы исследования

Выбор потенциально важных генов для развития коморбидности бронхиальной астмы и гипертонической болезни осуществлен с помощью интегративного подхода, комбинирующего данные о потенциальных генах подверженности заболеваниям, лекарственных мишенях и побочных эффектах лекарственных препаратов, используемых для их лечения. Для выбранных приоритетных генов коморбидности были отобраны eQTL SNPs как наиболее интересные варианты с точки зрения их возможного эффекта на риск развития коморбидности бронхиальной астмы и гипертонической болезни с использованием ресурсов GTEx [<http://www.gtexportal.org>] и Blood eQTL [Westra et al., 2013].

Выбранные вышеуказанным способом генетические варианты исследованы в трех основных выборках пациентов: (1) с изолированной бронхиальной астмой, (2) с бронхиальной астмой в сочетании с гипертонической болезнью, (3) с гипертонической

болезнью без бронхиальной астмы в анамнезе. Диагноз «бронхиальная астма» и «гипертоническая болезнь» установлен на основании клинического обследования пациентов согласно общепринятым критериям. Выборку пациентов с изолированной бронхиальной астмой ($n=145$, средний возраст $\pm$ S.D. $44,89 \pm 8,86$ лет) составили 73,1 % женщин и 25,9 % мужчин; с изолированной гипертонической болезнью в анамнезе ($n=144$, $51,27 \pm 6,05$ лет) – 32,6 % женщин и 67,4 % мужчин; с бронхиальной астмой в сочетании с гипертонической болезнью ($n=146$, $56,32 \pm 10,47$ лет) - 72,6 % женщин, 27,4 % мужчин.

Кроме того, для сравнения все пациенты из группы с коморбидностью бронхиальной астмы и гипертонической болезни были разделены на 2 подгруппы, различающиеся по времени манифестации каждого из заболеваний относительно друг друга: пациенты, у которых развитие бронхиальной астмы предшествовало развитию гипертонической болезни ($n=64$; средний возраст 61,2 года); пациенты, у которых развитие гипертонической болезни предшествовало развитию бронхиальной астмы ($n=33$; средний возраст 59,6 лет).

Контрольная группа включала индивидов без клинических проявлений бронхиальной астмы и гипертонической болезни ($n=152$, в том числе 112 женщин и 40 мужчин; средний возраст в группе составил $47,8 \pm 9,9$ лет).

Генотипирование образцов ДНК, экстрагированной из периферической крови пациентов и индивидов контрольной выборки, проводили с помощью масс-спектрометрии на приборе Sequenom MassARRAY® (США). Для создания панелей, включающих 96 выбранных регуляторных SNPs, использовано программное обеспечение Genotyping Assay Design, анализирующее возможность мультиплексирования выбранных маркеров и автоматически генерирующее последовательности праймеров и зондов для генотипирования с помощью масс-спектрометрии.

Обязательным этапом процедуры анализа выполнена проверка соответствия наблюдаемого распределения генотипов ожидаемому при равновесии Харди–Вайнберга (PXB) с помощью точного теста Фишера [Вейр, 1995]. Гаплотипы оценивали с помощью алгоритма EM, аналогичного методу, описанному Qin et al. [2002]. Анализ ассоциаций SNPs, а также гаплотипов с развитием заболеваний выполнен с использованием логистической регрессии с поправкой на пол и возраст в программной среде R. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена. Для визуализации различий между изолированными и коморбидными заболеваниями использовали кластерный анализ по методу Уорда и многомерное шкалирование [Сошникова и соавт., 1999], основанные на частотах аллелей изученных регуляторных SNPs.

3.2. Результаты и обсуждение

Анализ ассоциаций генов-кандидатов с развитием коморбидности «бронхиальная астма и сердечно-сосудистые заболевания». В результате биоинформатического поиска потенциальных генов кандидатов, связанных с развитием бронхиальной астмы и артериальной гипертензии, и последующей приоритизации установлены гены-кандидаты коморбидности этих заболеваний, включая гены *IL10*, *TLR4*, *CAT*, *NFKB1*, *ACT1*, *ADRB2*, *ICAM1*, *CST3*, *POMC*, *SPPI* [Saik et al., 2018; Zolotareva et al.,

2019], полиморфизм которых (96 SNPs) был изучен у пациентов с изолированными и коморбидными состояниями.

Согласно полученным данным кластерного анализа и многомерного шкалирования, основанных на частотах аллелей исследуемых SNPs, наблюдается относительно невысокая гетерогенность исследуемых групп индивидов с коморбидным фенотипом и изолированными бронхиальной астмой и гипертонической болезнью (Рисунок 5). Тем не менее, необходимо отметить, что выборка с синтропией бронхиальной астмы и гипертонической болезни наиболее удалена по частотам аллелей от других групп пациентов.

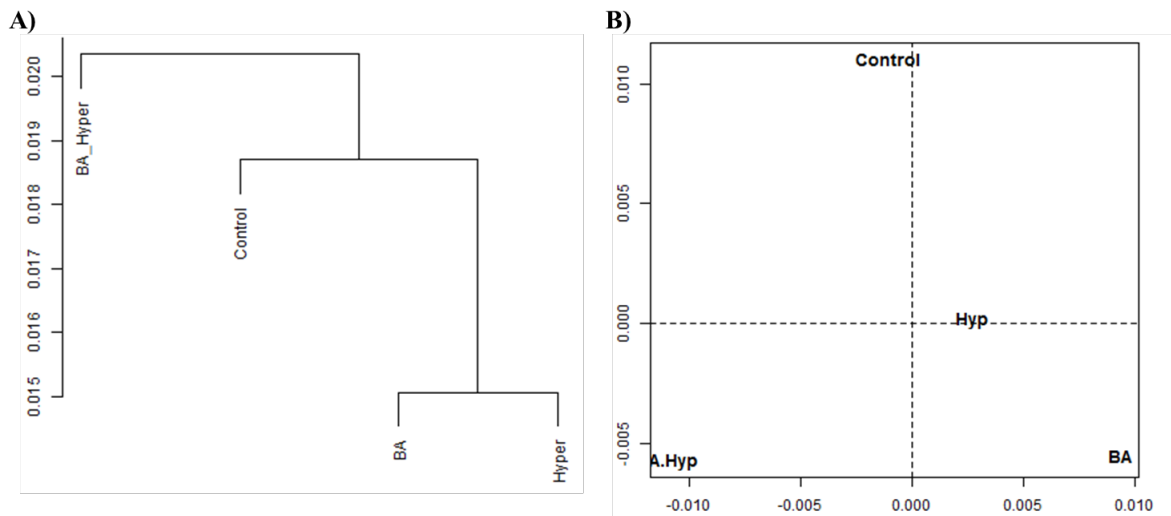


Рисунок 5 – Кластерная дендрограмма А) и график многомерного шкалирования В) для групп пациентов с изолированными бронхиальной астмой (BA), гипертонической болезнью (Hyper/Hyp), их сочетанной формой (BA_Hyper/Hyp) и контрольной выборки (Control), основанных на данных о частотах аллелей исследуемых SNPs.

С развитием изолированной бронхиальной астмы ассоциированы три SNPs, являющиеся eQTL для гена *TLR4*, два из которых rs1927914 ($p = 0,0397$) и rs1928298 ($p = 0,0442$) находятся почти в полном сцеплении в исследуемых группах ($r^2 = 0,954$, $D' = 0,979$) и влияют на его экспрессию в различных тканях. Еще один вариант, ассоциированный с развитием бронхиальной астмы (rs1980616; $p = 0,0462$) расположен в первом интроне гена *SERPINA1*. Ассоциации с бронхиальной астмой вариантов, локализованных в функционально активных регионах генома, обусловлены их потенциальной регуляторной способностью. Так, варианты rs1927914, rs1928298 расположены в области промотора гена *TLR4* и rs1980616 - энхансера гена *SERPINA1* и их регуляторный потенциал проявляется в клетках крови (в моноцитах). Кроме того, модификации гистонов в области rs1980616 (*SERPINA1*) регистрируются в других клетках и тканях, в том числе в клетках легких.

Ассоциации вариантов rs11065987 (*ATXN2-AS/BRAP*; $p = 0,0076$) и rs11191582 (*CYP17A1/CNNM2/NT5C2*; $p = 0,0419$) с развитием гипертонической болезни в настоящей работе, по сути, реплицируют у жителей г. Томска и Томской области результаты предыдущих исследований, в которых показаны ассоциации данного полиморфизма с ишемической болезнью сердца [Dichgans et al., 2014], а также известных для развития

сердечно-сосудистых заболеваний факторов риска, включая нарушение метаболизма холестерина, избыточную массу тела [Teslovich et al., 2010; Willer et al., 2013; Locke et al., 2015; Hoffmann et al., 2018; Huang et al., 2023].

Еще один полиморфизм, ассоциированный с гипертонической болезнью в настоящем исследовании – rs11669386 ($p = 0,0433$), расположен в интроне гена, кодирующего белок, содержащий домен рекрутирования каспаз 8 (*CARD8*). Рисковый для гипертонической болезни аллель A*rs11669386 гена *CARD8* приводит к повышению аффинности сайтов связывания нескольких транскрипционных факторов, среди которых факторы семейства Irf и Pou3f2. Генотип AA (rs11669386), по литературным данным, ассоциирован с повышением уровня экспрессии гена *CARD8* в артериях и головном мозге, а также с повышением экспрессии гена *CCDC114* в большеберцовой артерии, легких и цельной крови.

Ассоциация развития гипертонической болезни с полиморфным вариантом rs2284033 ($p = 0,0359$) гена рецептора интерлейкина-2, который участвует в опосредованных Т-клетками иммунных ответах (*IL2RB*), дополнительно указывает на многофакторную природу этого заболевания, в риск развития и прогрессии которого существенный вклад вносят многие факторы.

Среди изученных вариантов выявлены SNPs, которые ассоциированы с развитием синтропии бронхиальной астмы и гипертонической болезни. Ассоциированный вариант rs1010461 ($p = 0,0024$) расположен в 1-м интроне гена ангиогенина (*ANG*) и является eQTL как для гена *ANG*, так и гена рибонуклеазы 4 (*RNASE4*). Частота генотипа AA выше среди коморбидных пациентов по сравнению контролем (29,1 %), так же как вероятность развития сочетания бронхиальной астмы с гипертонической болезнью повышается в зависимости от носительства аллеля A ($OR = 1,6$, [95 CI %: 1,2–2,3]; $p = 0,003$).

С развитием синтропии исследуемых заболеваний наблюдали значимую связь с двумя полиморфизмами rs7038716 ($p = 0,0113$) и rs7026297 ($p = 0,0299$), находящимися в неравновесии по сцеплению ($D' = 0,974$; $r^2 = 0,949$). Оба варианта расположены в малоизученном регионе гена *LOC105376244* на расстоянии 611 нуклеотидов друг от друга. Функции гена *LOC105376244* неизвестны, однако кандидатным может выступать ген *TLR4*, поскольку ассоциированные варианты являются eQTL SNP для гена *TLR4*, который может вносить вклад в развитие синтропии бронхиальной астмы и сердечно-сосудистых заболеваний. Генотип AA (rs7038716), преобладающий в группе здоровых индивидов (63,9 %), является протективным относительно развития сочетания бронхиальной астмы и гипертонической болезни ($OR = 0,5$, 95 % CI [0,3–0,8]; $p = 0,006$).

Один из вариантов rs7025144, ассоциированный с синтропией бронхиальной астмы и гипертонической болезни, локализован в области энхансера, является eQTL SNP для гена *TLR4* ($p = 0,034$). Генотип CC значительно преобладал в контрольной выборке по сравнению с выборкой пациентов с коморбидностью ($OR = 0,6$ 95 % CI [0,4–0,9]; $p = 0,029$). Различий между группами пациентов с изолированными состояниями при сравнении с контрольной выборкой не обнаружено ($p > 0,05$). Ни один из этих трех eQTL вариантов для гена *TLR4* ранее не был изучен как в отношении развития изолированных исследуемых заболеваний, так и в отношении коморбидности между ними.

Полиморфный вариант rs2022318, являющийся eQTL для гена каталазы (*CAT*) и гена, кодирующего белок, содержащий анкирин-подобный повтор и ВТВ-домен, 2 (*ABTB2*),

ассоциирован с синтропией бронхиальной астмы и гипертонической болезни ($p = 0,044$). Риск развития вышеупомянутой коморбидности связан с аллелем С ($OR_C = 2,4$, 95 % CI [1,3–4,3]; $p = 0,003$; $OR_{CC} = 1,5$, 95 % CI [1,1–2,1]; $p = 0,017$).

В результате анализа ассоциаций гаплотипов для генов *IL10*, *TLR4* и *CAT* с изолированными бронхиальной астмой и гипертонической болезнью, а также их сочетанием установлен ряд особенностей. Гаплотипы, образованные полиморфными вариантами rs1800871, rs3024490 и rs3024492 гена *IL10*, не ассоциированы с исследуемыми изолированными и коморбидными патологическими состояниями. С развитием синтропии гипертонической болезни и бронхиальной астмы ассоциированы гаплотипы, включая гаплотип Т-С-Т, образованный вариантами rs10465133, rs7025144, rs7860332 гена *TLR4* ($p = 0,004$); гаплотип А-Г-С-А-Т-С - rs11032655, rs2022318, rs7934463, rs12806377, rs11032695, rs10836230 ($p = 0,005$); Т-С - rs11032699, rs11032700 ($p = 0,046$); гаплотип Г-Т-Г-А-Т-С-С-С-А-Т - rs1535721, rs7949972, rs11032723, rs12797274, rs17269847, rs2420386, rs7126243, rs7130331, rs7130345, rs7938373 гена *CAT* ($p = 0,016$). Полиморфные варианты ассоциированных комбинаций являются eQTL для генов *CAT* и *TLR4* в различных тканях.

Установлены ассоциации гаплотипов гена *CAT*, образованных вариантами rs1535721, rs7949972, rs11032723, rs12797274, rs17269847, rs2420386, rs7126243, rs7130331, rs7130345, rs7938373 с развитием изолированной бронхиальной астмы. Частота гаплотипа Г-С-С-А-С-Г-С-С-А-Т у больных бронхиальной астмой составила 10,3 %, что выше по сравнению с контрольной группой - 6,3 % ($p = 0,039$). Также как частота гаплотипа Г-Т-Г-А-Т-С-Т-Т-Г-С преобладала в группе пациентов с изолированной бронхиальной астмой (13,4 %) по сравнению с контролем (8,6 %, $p = 0,031$). Не выявлено ассоциаций гаплотипов генов *TLR4* и *CAT* с развитием изолированной гипертонической болезни.

Особенности феномо-геномных отношений бронхиальной астмы и гипертонической болезни. В результате оценки распространенности SNPs в фенотипических группах, различающихся по времени манифестации каждого из заболеваний относительно друг друга выявлено, что один из вариантов (rs11590807) ассоциирован с обоими фенотипами («БА + ГБ» и «ГБ + БА») вне зависимости от времени манифестации каждого из заболеваний относительно друг друга ($p < 0,05$). Вероятно, этот вариант в целом имеет отношение к развитию синтропии бронхиальной астмы с сердечно-сосудистой патологией, независимо от последовательности манифестации.

Ассоциация rs1010461 специфична для развития гипертонической болезни на фоне бронхиальной астмы. Аллель А, связанный с повышенной экспрессией генов *RNASE4* и *ANG* в цельной крови и легочной ткани, чаще регистрируется в группе пациентов с фенотипом «БА + ГБ» (61,7 %) по сравнению с контролем (50,0 %). Шанс развития этого фенотипа у носителей аллеля rs1010461*А составляет 1,61 (95 % CI: 1,03–2,52; $p = 0,034$).

С развитием фенотипа «ГБ + БА» связаны варианты, включая rs769214*G: $OR = 1,87$ (95 % CI: 1,04–3,34); $p = 0,034$; rs11032700*С: $OR = 2,05$ (95 % CI: 1,15–3,65); $p = 0,013$; rs11032699*Т: $OR = 1,83$ (95 % CI: 1,03–3,28); $p = 0,040$; rs484214*G: $OR = 1,90$ (95 % CI: 1,05–3,44); $p = 0,033$; и rs480575*G: $OR = 2,21$ (95 % CI: 1,2–4,0); $p = 0,007$), регулирующие экспрессию преимущественно гена *CAT* во многих тканях. В отличие от большинства работ, сосредоточенных на изучении подверженности отдельным патологическим фенотипам, эта часть исследования фиксирует факт того, что разные варианты генов могут

быть вовлечены в развитие синтропии бронхиальной астмы и гипертонической болезни в зависимости от последовательности развития каждого из заболеваний.

4. ГЕНЫ-КАНДИДАТЫ ДИСТРОПИИ «БРОНХИАЛЬНАЯ АСТМА И ТУБЕРКУЛЕЗ»

4.1. Материалы и методы исследования

Для поиска генетических факторов, связанных с дистропией бронхиальной астмы и туберкулеза, использовано два методологических подхода: (1) один подход базировался на исследовании изменчивости ключевых генов, играющих роль в поляризации Th1/Th2 иммунного ответа; (2) второй подход - на использовании методологии реконструкции и анализа генных сетей.

В качестве меры, оценивающей «близость» между двумя заболеваниями по общности/специфичности генов/белков из ассоциативных генных сетей, использовали несколько измерений, включая бинарный индекс Жаккара (JI), отражающий сходство между заболеваниями по количеству общих генов/белков; показатель meet/min, который оценивали как количество генов/белков, ассоциированных с обоими заболеваниями, разделенное на количество генов/белков, связанных с заболеванием, которое имеет меньшее белковое окружение. Статистическая значимость связанности изучаемой пары болезней оценивали как отношение пар со степенью связности большей или равной изучаемой паре среди 10 000 случайных пар заболеваний. В качестве поправки на множественные сравнения использовался метод Бенджамини-Хохберга [Benjamini, Hochberg, 1995].

Регуляторные эффекты SNPs оценивали с помощью ресурса RegulomeDB, где минимальный балл предполагает высокую вероятность влияния полиморфизма на изменение экспрессии соответствующего гена [Boyle et al., 2012], а также HaploReg v4.2 [Ward, Kellis, 2012].

В исследование включены 233 пациента ($41,5 \pm 13,3$ лет) с диагнозом «атопическая бронхиальная астма», в том числе 60 мужчин ($36,4 \pm 13,5$ лет) и 173 женщины ($43,2 \pm 12,7$ лет). Обследовано 412 пациентов с туберкулезом ($29,7 \pm 16,9$ лет), среди которых 270 мужчин ($32,9 \pm 16,6$ лет) и 142 женщины ($23,4 \pm 15,7$ лет).

Контрольная группа для исследования генов, связанных с развитием дистропии бронхиальной астмы и туберкулеза, сформирована относительно здоровыми лицами без атопической бронхиальной астмы и туберкулеза в анамнезе ($n = 560$, $39,9 \pm 17,1$ лет), в том числе 205 мужчин ($44,5 \pm 16,9$ лет) и 355 женщин ($37,9 \pm 16,2$ лет).

Для оценки функциональности ассоциированных с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза полиморфных вариантов сформирована выборка относительно здоровых доноров ($n = 50$) в возрасте от 18 до 50 лет без клинических проявлений бронхиальной астмы и туберкулеза в анамнезе.

Генотипирование полиморфных вариантов генов цитокиновых лигандов и рецепторов и внутриклеточных сигнальных молекул, участвующих в контроле баланса между клеточным (Th1) и гуморальным (Th2) иммунитетом (*STAT5B*; *PIAS3*; *PIASY/PIAS4*; *IFNGR2*; *IFNG*; *SOC5*; *GATA3*; *TBX21*), а также генов, потенциально значимых для дистропии, выявленных с помощью анализа генных сетей: *TNF*, *LTA*, *TNFRSF1B*, *IL1B*, *IL6*, *CD4*, *IL10*, *CXCL10*, *SLC11A1*, выполнено в группах пациентов с бронхиальной астмой, туберкулезом, а также в контрольной выборке. Для генотипирования полиморфных

вариантов с помощью ПЦР-ПДРФ анализа, анализа кривых плавления высокого разрешения, ПЦР в режиме реального времени использованы образцы ДНК, экстрагированные из образцов периферической крови стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. Полученные данные о распространенности полиморфных вариантов в исследуемых группах оценивали с помощью общепринятых статистических процедур.

Экспрессионные исследования проводили с помощью методов и подходов, позволяющих изучить функциональную значимость полиморфных вариантов генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза, и определить контекстную зависимость, используя различные стимуляторы, вызывающие иммунный ответ. Выбранные для исследования стимуляторы активируют отдельные, хорошо охарактеризованные сигнальные пути, связанные с антибактериальным ответом и воспалительной реакцией (IFN- γ , TDM, LPS), а также проаллергический путь IL4, который индуцирует дифференцировку наивных Т-хелперов (Th0-клеток) в Th2-клетки. Вариабельность экспрессии генов изучена в стимулированных и нестимулированных культурах мононуклеарных клеток венозной крови здоровых доноров с помощью ПЦР в реальном времени.

Для определения функционального влияния однонуклеотидного полиморфизма на транскрипционную активность генов в выборке здоровых доноров изучена представленность генотипов по вариантам rs2239704, rs652625, rs4386624, rs56061981. В результате выполнения этого этапа проекта выбраны доноры с разными генотипами по исследуемым вариантам (не менее 5 индивидов с каждым генотипом). У этих индивидов повторно осуществлен забор периферической крови в объеме 9,0 мл в 3 пробирки с гепарином (суммарно 25,5–27,0 мл от одного индивида) для культуральных работ с мононуклеарными клетками.

Выделение мононуклеаров из периферической крови осуществляли методом градиентного центрифугирования. Мононуклеарные клетки в краткосрочной культуре в полной питательной среде были обработаны с помощью индукторов, которые добавляли непосредственно при посадке краткосрочных культур мононуклеаров в культуральные флаконы в следующих конечных концентрациях: LPS – 100 нг/мл, TDM – 100 нг/мл, IFN- γ – 100 нг/мл, IL4 – 20 нг/мл. Для получения контрольных образцов мононуклеары инкубировали без добавления каких-либо индукторов. После инкубации (в течение 1 часа и 24 часов при 37°C) к клеточному осадку добавлялся реагент для лизиса клеток Лира (Биолабмикс) из расчета 1 мл на 2–5 млн клеток, после чего приступали к экстракции РНК. Экстракцию и очистку мРНК проводили сорбентно-колоночным методом с использованием набора (Thermo Scientific, # K0871) согласно протоколу фирмы-производителя.

Для анализа уровней экспрессии генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза, использовали сравнительный $\Delta\Delta C_q$ метод, при котором уровень экспрессии исследуемых генов нормализовали относительно количества мРНК референсных генов (*GAPDH*, *ACTINB*), а в качестве контроля использовали соответствующие показатели из нестимулированных культур.

В случае данных экспрессии гена с нормальным распределением приведено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($\bar{X} \pm SD$), в остальных случаях - медиана, минимальное и максимальное значение. Для сравнения зависимых переменных, а именно уровней

экспрессии генов в стимулированных краткосрочных культурах мононуклеаров относительно нестимулированных культур использовали критерий Уилкоксона. В случае многогруппового сравнения параметрические данные анализировались с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а непараметрические – с помощью критерия Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни. В случае значимых различий между группами, полученными в результате однофакторного дисперсионного анализа, выполнен *post-hoc* анализ (тест наименьшей значимой разницы (LSD (Least Significant Difference), оценивающий за счет какой из группы достигаются различия. Для статистических расчетов использован пакет программ STATISTICA 10.0 (разработчик – StatSoft Inc.).

4.2. Результаты и обсуждение

Поиск генов-кандидатов дистропии «бронхиальная астма и туберкулез» с помощью анализа ассоциативных генных сетей. В результате анализа ассоциативных генных сетей было обнаружено, что с бронхиальной астмой связано 586, а с туберкулезом - 131 белков/генов. Из этого числа только 69 белков/генов являются общими для рассматриваемых заболеваний. Оценка связанности показала, что бронхиальная астма и туберкулез тесно связаны в сравнении со случайными парами болезней, по всем трем критериям связанности, которые были использованы в работе (количество общих белков ($p = 0,0004$), индекс Жаккара ($p = 0,017$) и мера *meet/min* ($p = 0,0364$)).

После экспертной оценки список общих белков для бронхиальной астмы и туберкулеза сократился до 19, включая *IL2*, *IL8*, *IL10*, *IL12B*, *TNF*, *LTA*, *IFNG*, *HLA-DQB1*, *HLA-DRB1*, *CCL2*, *IL1B*, *IL4*, *IL6*, *CXCL10*, *SPP1*, *VDR*, *SLC11A1*, *TNFRSF1B*. Также после экспертизы сократились списки так называемых специфических генов/белков, которые ассоциированы только с одним из рассматриваемых заболеваний. Для астмы количество генов/белков уменьшилось с 586 до 247 после экспертизы, для туберкулеза - с 131 до 21. Анализ обогащения в терминах GO для 19 общих белков/генов выявил 1262 статистически значимых биологических процесса. Общие гены преимущественно связаны с иммуноопосредованными процессами, такими как «регуляция процессов иммунной системы», «иммунный ответ», «ответ на бактерию» и «регуляция ответа на внешние стимулы». Наиболее значимый процесс, в который вовлечены общие для бронхиальной астмы и туберкулеза гены, относится к «положительная регуляция иммунного процесса» ($p_{FDR} = 4,31E-16$).

Необходимо отметить, что общие белки/гены для бронхиальной астмы и туберкулеза участвуют как в Th1-, так и Th2-связанных процессах. Например, «иммунный ответ Th1 типа» и «положительная регуляция иммунного ответа типа Th1» были представлены белками/генами *NRAMP1*, *IL12*, *IL4*, *HLA DRB1*1*. Такие процессы, как «иммунный ответ Th2 типа» и «регуляция иммунного ответа Th2 типа» представлены общими белками/генами *IL4*, *IL6* и *IL10*. Таким образом, взаимодействие между этими белками, связанное с негативной регуляцией экспрессии, может лежать в основе взаимного подавления иммунных ответов Th1 и Th2.

Ассоциации генов-кандидатов дистропии «бронхиальная астма и туберкулез». При сравнении больных бронхиальной астмой, туберкулезом и здоровых индивидов обнаружены различные паттерны ассоциаций полиморфных вариантов ключевых генов, играющих роль в поляризации Th1/Th2 иммунного ответа, с разными заболеваниями. Полиморфизм rs2069705 является единственным вариантом, который ассоциирован как с

бронхиальной астмой, так и с туберкулезом (Таблица 3). Полиморфизм rs2069705 является eQTL вариантом в иммунных клетках, прежде всего, для двух генов, включая *IFNG* и *MDM1*. Присутствие аллеля rs2069705*А формирует сайты связывания для транскрипционных факторов Nkx2_3 и Pou1f1_2. Вероятно, что именно эти сайты связывания являются необходимыми для обеспечения функциональности промоторных регионов этих генов.

Таблица 3 – Отношение шансов для генотипов и аллелей по варианту rs2069705 в связи с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза

SNP	Патология	Частота ассоциированного генотипа, аллеля: больные/здоровые	OR (95 % CI); p
rs2069705	Бронхиальная астма	GG: 17,3/27,8	0,54 (0,31-0,97); 0,0381
		GA: 61,5/45,2	1,94 (1,22-3,09); 0,0051
	Туберкулез	GG: 19,2/27,8	0,62 (0,42-0,92); 0,0167
		G: 43,4/50,4	0,75 (0,59-0,95); 0,0191
		A: 56,6/49,6	1,33 (1,05-1,68); 0,0191

Примечание. OR – отношение шансов; 95 % CI – 95 % доверительный интервал; p – достигнутый уровень значимости различий.

Относительно специфичных ассоциаций отдельных вариантов с исследуемыми заболеваниями было установлено следующее: с риском развития только бронхиальной астмы связаны полиморфные варианты rs12756687 (*PIAS3*) и rs6737848 (*SOCS5*), с риском развития только туберкулеза – rs3760903 (*PIASY*).

У больных бронхиальной астмой существенно преобладал генотип CC (23,4 %) и аллель C (41,6 %) варианта rs12756687 (*PIAS3*) по сравнению с контролем (11,6% и 36,1%, соответственно). Гомозиготность по аллелю rs12756687*С является предрасполагающим фактором к развитию бронхиальной астмы (OR = 2,17; 95 % CI:1,1-4,2; p = 0,010). Необходимо отметить, что распространенность рискованного для развития бронхиальной астмы гомозиготного генотипа CC (rs12756687) у больных с туберкулезом снижена по сравнению с пациентами с бронхиальной астмой (23,4 %) и составляет 15,4 %. При сравнении распространенности генотипов между выборками пациентов с бронхиальной астмой и туберкулезом установлены статистически значимые различия (p = 0,034).

В выборке больных бронхиальной астмой преобладали генотип CC (91,26 %) и аллель C (95,15 %) варианта rs6737848, регулирующего экспрессию гена супрессора цитокиновой сигнализации 5 (*SOCS5*), по сравнению с контрольной группой. Отношение шансов развития бронхиальной астмы для индивидов с генотипом CC варианта rs6737848 составляет 2,63 (95 % CI:1,2-5,6; p = 0,013).

Анализ ассоциаций регуляторных SNPs в общих для бронхиальной астмы и туберкулеза генах, выявленных с помощью анализа ассоциативных генных сетей, позволил установить связь с развитием обоих заболеваний полиморфизма rs2239704 (Таблица 4). Полиморфизм rs2239704 может регулировать экспрессию генов, расположенных на 6 хромосоме, включая *LTA* (*TNFB*) и *TNF*, важных для функционирования иммунной системы. Помимо полиморфизма rs2239704 в исследовании выявлены ассоциации с

другими вариантами, но их эффект можно считать специфичным в отношении рассматриваемых заболеваний (Таблица 4).

Таблица 4 – Ассоциации полиморфных вариантов генов с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза

SNP (ген)	Генотип, аллель*	БА, %	Контроль, %	ТБ, %	p ¹	p ²
rs2239704 (<i>TNFB</i>)	A/A	28,1	36,1	25,0	0,151	0,013
	A/C	43,3	41,2	47,4		
	C/C	28,7	22,7	27,6		
	Аллель С	50,3	43,3	51,3	0,040	0,006
rs652625 (<i>TNFRSF1B</i>)	T/T	91,2	82,5	87,3	0,014	0,090
	T/A	8,2	17,1	11,8		
	A/A	0,6	0,4	0,6		
	Аллель А	4,7	8,9	6,5	0,013	0,075
rs4386624 (<i>CXCL10</i>)	C/C	29,8	33,1	26,3	0,634	0,056
	C/G	51,4	47,7	49,5		
	G/G	18,8	19,3	24,2		
	Аллель G	44,5	43,1	48,9	0,642	0,017
rs56061981 (<i>CXCL10</i>)	G/G	93,9	92,5	88,4	0,787	0,104
	G/A	5,7	7,1	10,8		
	A/A	0,4	0,4	0,8		
	Аллель А	3,3	4,0	6,2	0,653	0,041

Примечание. *Приведена частота минорных аллелей. БА – бронхиальная астма; ТБ – туберкулез; p¹ – уровень значимости различий, достигнутый при сравнении больных БА и контролем; p² – уровень значимости различий, достигнутый при сравнении больных ТБ и контролем.

В частности, ассоциация выявлена в связи с развитием бронхиальной астмы полиморфизма rs652625 (*TNFRSF1B*). У пациентов с бронхиальной астмой частота минорного аллеля rs652625*А составила 4,7 %, с туберкулезом - 6,5 % и в контрольной группе - 8,9 %, однако значимые отличия получены только при сравнении пациентов с бронхиальной астмой и контрольной группы (p = 0,014 для генотипов; p = 0,013 – для аллелей). Также установлены ассоциации с развитием туберкулеза двух eQTL вариантов гена *CXCL10*, включая rs4386624 и rs56061981 (Таблица 4).

Наблюдаются выраженные индивидуальные различия в экспрессии гена *TNF* как при воздействии цитокина врожденного и адаптивного иммунного ответа (IFN-γ) и стимула микробного происхождения (LPS), так и в зависимости от генотипов по варианту rs2239704 (Таблица 5).

В стимулированных с помощью IFN-γ и LPS мононуклеарных клетках максимальные значения уровня экспрессии гена *TNF* регистрируются у индивидов с генотипами CC ($\bar{X} \pm SD = 0,0536 \pm 0,0295$ (IFN-γ); $0,0914 \pm 0,0397$ (LPS)) и CA ($\bar{X} \pm SD = 0,0517 \pm 0,0237$ (IFN-γ); $0,0950 \pm 0,0329$ (LPS)) по сравнению с гомозиготами AA ($\bar{X} \pm SD = 0,0214 \pm 0,0147$ (IFN-γ); $0,0401 \pm 0,0251$ (LPS)) по варианту rs2239704.

Таблица 5 – Экспрессия гена *TNF* в зависимости от вида индуктора и генотипа индивида по варианту rs2239704

архиву 182239761

Генотип	n	$\bar{X} \pm SD$	Min	Max	p ANOVA (p LSD)
IFNG					
AA	6	0,0214 ± 0,0147	0,0046	0,0401	0,0562 (p ^{AA vs CA} = 0,0355; p ^{AA vs CC} = 0,0440)
CA	6	0,0517 ± 0,0237	0,0219	0,0809	
CC	4	0,0536 ± 0,0295	0,0137	0,0787	
IL4					
AA	6	0,0119 ± 0,0063	0,0043	0,0201	0,3884
CA	6	0,0185 ± 0,0102	0,0072	0,0375	
CC	4	0,0236 ± 0,0224	0,0039	0,0539	
LPS					
AA	6	0,0401 ± 0,0251	0,0109	0,0682	0,0280 (p ^{AA vs CA} = 0,0189; p ^{AA vs CC} = 0,0234)
CA	6	0,0950 ± 0,0329	0,0586	0,1672	
CC	4	0,0914 ± 0,0397	0,0489	0,1236	
TDM					
AA	6	0,0141 ± 0,0085	0,0041	0,0233	0,2964
CA	6	0,0237 ± 0,0139	0,0092	0,0491	
CC	4	0,0331 ± 0,0314	0,0071	0,0730	
без стимула					
AA	6	0,0185 ± 0,0145	0,0048	0,0434	0,5521
CA	6	0,0259 ± 0,0169	0,0139	0,0577	
CC	4	0,0337 ± 0,0335	0,0059	0,0785	

Примечание. $\bar{X} \pm SD$ – среднее значение экспрессии гена ± стандартное отклонение; Min – минимальное значение; Max – максимальное значение; p ANOVA – значимость различий при сравнении средних значений уровня экспрессии гена *TNF* у носителей разных вариантов генотипов по варианту rs2239704, достигнутая с помощью однофакторного дисперсионного анализа. В скобках приведено значение p LSD – уровень значимости различий, достигнутый статистическим тестом LSD, оценивающим за счет какой из генотипических групп получены различия.

Таким образом, ассоциированный с риском развития бронхиальной астмы и туберкулеза аллель rs2239704*С, имеет выраженное функциональное значение на ранних этапах иммунного ответа, проявляющееся изменением экспрессии провоспалительного цитокина в мононуклеарных клетках при воздействии цитокина IFN-γ и стимула микробного происхождения LPS. Полученные результаты показывают, что ассоциированный с дистропными заболеваниями аллель, может иметь функциональные последствия преимущественно для развития инфекционного заболевания, а в отсутствии соответствующей нагрузки не проявляет эффекта.

Все ассоциированные гены, выявленные с помощью комплексного подхода выполненного исследования, демонстрируют, что, несмотря на их различные эффекты в отношении рассматриваемых фенотипов, белки, кодируемые этими генами, образуют 3 основных взаимодействующих кластера, включая иммунный ответ через IFN-γ сигналинг, продукцию TNF и регуляцию внутриклеточной активности (Рисунок 6).

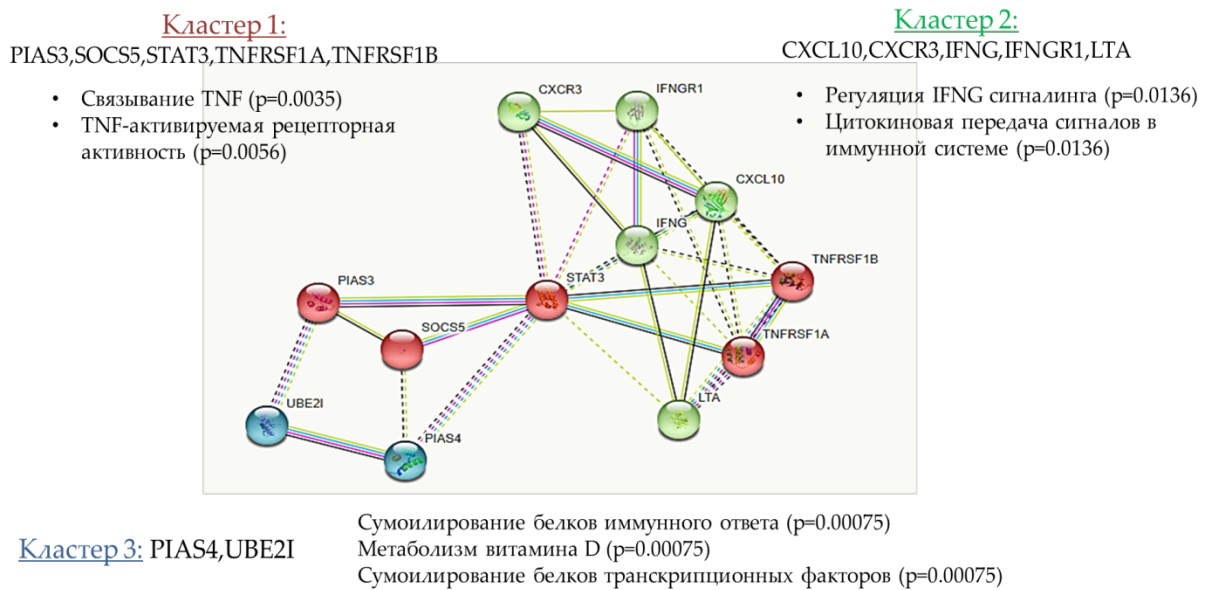


Рисунок 6. Кластеры ассоциированных с бронхиальной астмой и туберкулезом генов и основные биологические процессы, в которые они вовлечены. Разные кластеры выделены цветами (кластер 1 – красный, кластер 2 – зеленый, кластер 3 – синий).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что, по сути, как бронхиальная астма, так и туберкулез являются вариантами одного феномена, связанного с дисфункцией иммунного ответа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель проведенного исследования заключалась в оценке патогенетической связи между болезнями многофакторной природы с позиции концепции болезней синтропий и дистропий, а также выявлении синтропных/дистропных генов для развития бронхиальной астмы и ее фенотипических ассоциаций с аллергическими заболеваниями и гипертонической болезнью (синтропия), а также контрассоциацией с туберкулезом (дистропия).

Анализ ассоциативных генных сетей распространенных МФЗ по спектру общих и специфических генов установил некоторые особенности. С одной стороны, очевидна специфичность категорий рассматриваемых заболеваний согласно имеющимся данным об их патогенезе с известными клиническими проявлениями, что выражается некоторой удаленностью болезней с выраженной иммунологической компонентой по отношению к сердечно-сосудистым болезням и их факторам риска. С другой стороны, очевиден общий генетический компонент, связывающий исследуемые заболевания разной этиологии. Оценка функциональной значимости общих для большинства исследуемых заболеваний генов показала их вовлеченность преимущественно в регуляцию воспалительных реакций и функционирование иммунной системы, включая процессы передачи сигналов цитокинами, регуляцию экспрессии генов транскрипционными факторами, активацию иммунного эффекторного процесса. Это дает основание полагать, что генетический контроль иммунновоспалительной компоненты является важным для феномо-геномных связей аллергических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых, метаболических, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний, и указывает на универсальность данного процесса, независимо от того, в каком органе или ткани развилось первоначально одно из сопутствующих заболеваний.

Одним из важных результатов оценки известных на сегодня общих /специфических генов аллергических заболеваний, включая бронхиальную астму, аллергический ринит / атопический дерматит, является то, что исследуемая синтропия представляет собой отличный от соответствующих изолированных состояний фенотип. Гены изолированной бронхиальной астмы в меньшей степени являются общими с бронхиальной астмой в коморбидности с другими аллергическими заболеваниями, а большинство генов (52,9 %) специфичны для развития только коморбидного фенотипа бронхиальной астмы. Обращает на себя внимание факт, что функция генов, вовлеченных в развитие бронхиальной астмы и сопутствующих ей аллергического ринита / атопического дерматита, прежде всего, связана с нарушением эпидермального барьера, делая кожный барьер отправной точкой коморбидности аллергических заболеваний. В то же время согласно функциональной аннотации генов изолированной бронхиальной астмы и других аллергических заболеваний, активация иммунной системы и регуляция воспалительных реакций являются наиболее важными для их развития. Кроме того, в результате анализа полногеномных данных установлены ассоциации, различающиеся в группах с изолированными аллергическими заболеваниями и их сочетанием. Три полиморфных варианта, включая rs1837253 (*AC010395.1/TSLP*), rs11742240 (*IL7R/AC112204.3*) и rs1555926 (*ZNF217*) ассоциированы с развитием бронхиальной астмы; rs2197415 (*AC044784.1/LINC00709*) ассоциирован с развитием атопического дерматита; rs906363 (*AL590648.3/BATF3*) и rs7755224 (регион генов *HLA*) оказались значимы для развития бронхиальной астмы коморбидной с аллергическим ринитом и атопическим дерматитом.

Впервые использован комплексный подход к выбору генов и регулирующих их полиморфных вариантов, которые связаны как с патогенезом бронхиальной астмы и артериальной гипертензии, так и ответом на лечение, и могут повлиять на развитие коморбидности между ними. В результате генотипирования широкого спектра выбранных вариантов установлены особенности, связанные с различающейся генетической подверженностью коморбидности бронхиальной астмы и гипертонической болезни (*ANG/RNASE4*; *LOC105376244/TLR4*; *ABTB2/CAT*) от соответствующих изолированных состояний. С развитием бронхиальной астмы ассоциированы SNPs, регулирующие экспрессию генов *TLR4*, *SERPINA1*, а с развитием гипертонической болезни - *ATXN2-AS/BRAP*; *CYP17A1-CNNM2-NT5C2*; *IL2RB*. Гены, продукты которых вовлечены в воспалительные реакции, процессы окислительного стресса, неоваскуляризации вносят значительный вклад в коморбидность бронхиальной астмы и гипертонической болезни. Важно отметить, что разные генетические варианты связаны с развитием коморбидности бронхиальной астмы и гипертонической болезни в зависимости от времени начала каждого из заболеваний. Развитие гипертонической болезни на фоне бронхиальной астмы связано с SNPs (rs769214, rs11032700, rs11032699, rs484214, rs480575), регулирующими преимущественно экспрессию гена *CAT*, а подверженность бронхиальной астме у пациентов с гипертонической болезнью связана с rs1010461, являющимся eQTL для генов *RNASE4* и *ANG*. eQTL полиморфизм rs11590807 для генов *UTP25*, *TRAF3IP3*, *C1orf74*, *HSD11B1-AS1*, *IRF6*, в том числе в тканях сердца, сосудов, а также легких, ассоциирован с бронхиальной астмой коморбидной с гипертонической болезнью независимо от начала каждого из заболеваний.

В результате исследования дистропных отношений между бронхиальной астмой и туберкулезом установлены варианты, оказывающие влияние на риск развития как бронхиальной астмы, так и туберкулеза. Гены, кодирующие цитокины, тесно связанные с функцией Th1-клеток, являются вариантами подверженности каждому из рассматриваемых заболеваний (*IFNG* (rs2069705), *TNF/LTA* (rs2239704)). Установлено, что в зависимости от генотипа по варианту rs2239704 и активации пути IFN- γ , и в LPS-индуцированной модели воспаления изменяется уровень экспрессии гена *TNF*. Таким образом, степень активности патологического процесса, оказывающего влияние на развитие заболевания, зависит от генотипа индивида. Основные молекулярные функции генов, ассоциированных с развитием заболеваний, относятся к цитокиновой активности, связыванию с рецепторами и белками, регуляции активности TNF – важной молекулы как с точки зрения риска развития туберкулеза, так и утяжеления симптомов бронхиальной астмы. Это дает основание предположить, что инфекционные и аллергические заболевания представляют собой варианты одного патологического феномена, обусловленного нарушенной работой иммунной системы, основанного на общей генетической составляющей. Установлены полиморфные варианты, которые связаны только с одним из фенотипов, в частности, с бронхиальной астмой ассоциированы варианты rs12756687 (*PIAS3*), rs6737848 (*SOCS5*) и rs652625 (*TNFRSF1B*); с туберкулезом – rs3760903 (*PIAS1*), rs56061981 и rs4386624 (*CXCL10*). Эти варианты, ассоциированные только с бронхиальной астмой/туберкулезом, имеют наибольшее значение для активации и поляризации иммунной системы в патогенезе аллергических/инфекционных заболеваний, в частности, необходимы для внутриклеточной сигнализации и супрессии действия цитокинов.

Таким образом, феномен сочетания болезней представляет самостоятельный интерес для исследований фундаментального характера, становится дополнительным путем выяснения этиологии и патогенеза сложных заболеваний. Молекулярная природа сопутствующих заболеваний, которая позволяет им быть связанными вместе во многих, зачастую не смертельных и даже полезных сочетаниях, остается сложной для объяснения в силу некоторой «вольности генома», определяемой динамическим и нелинейным характером функционирования системы, регулируемой обратными связями, которые могут нарушаться предсказуемым, но индивидуальным образом [Пузырев, 2002]. Степень пользы или вреда таких комбинаций болезней условного «адаптивного» фенотипа зависит от компромиссов, которые наиболее очевидны вследствие конкуренции за ограниченные ресурсы организма. Вероятно, уязвимость для одних заболеваний относительно небольшого риска развития других сводится к определению некоторой «цены сложности», основой которой является плеiotропное действие генов. Исследование медицинских аспектов разного уровня сочетаний клинических фенотипов позволяет оценить пользу/вред взаимоотношений между болезнями, решая задачи трансляционной геномики, в том числе в области диагностики и терапии заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Анализ *in silico* ассоциативных генных сетей 22 болезней многофакторной природы показал, что 1207 генов (15,7 %) вовлечены в более чем одно заболевание. Общая функциональная компетенция генов, лежащих в основе разных по своей природе заболеваний, определяется участием в сигнальном пути цитокинов ($\text{Log}(q\text{-value}) = -22,94$), AP1 регуляции ($\text{Log}(q\text{-value}) = -19,82$),

- регуляции воспалительного ответа ($\text{Log}(q\text{-value}) = -18,77$), позитивной регуляции иммунного эффекторного процесса ($\text{Log}(q\text{-value}) = -15,38$), участием в IL23 сигналинге ($\text{Log}(q\text{-value}) = -13,31$).
2. В результате многомерного шкалирования и кластерного анализа, основанного на общности /специфичности генов, выявленных в ассоциативных генных сетях, установлено, что болезни с выраженной иммунологической компонентой близки между собой, так же, как и болезни сердца и сосудов, но изолированы относительно каждой из двух рассматриваемых групп.
 3. Выявлено, что 52,9 % генов, ассоциированных с бронхиальной астмой, коморбидной с аллергическим ринитом/дерматитом, не влияют на развитие соответствующих изолированных патологических состояний. По спектру общих и специфических генов установлено, что фенотип бронхиальной астмы в сочетании с аллергическим ринитом/атопическим дерматитом более близок к аллергическому риниту/атопическому дерматиту ($JI = 0,3454$) по сравнению с изолированной бронхиальной астмой ($JI = 0,2404$). Гены, ассоциированные с коморбидным фенотипом аллергических заболеваний, участвуют в функционировании эпидермального барьера (GO:0031424: кератинизация $\text{Log}(q\text{-value}) = -38,49$), а гены, ассоциированные с изолированными аллергическими заболеваниями - в активации иммунной системы и регуляции воспалительных реакций (GO:0030183: дифференцировка В-лимфоцитов) $\text{Log}(q\text{-value}) = -0,52$; GO:0007249: каноническая передача сигнала NF- κ B) $\text{Log}(q\text{-value}) = -0,48$). Общие гены, участвующие в развитии как изолированных, так и синтропных форм аллергических заболеваний, обогащены в категориях, имеющих отношение к активации противовоспалительного ответа и иммунных реакций (GO:0045321: активация лейкоцитов) $\text{Log}(q\text{-value}) = -12,21$; GO:0001819: позитивная регуляция продукции цитокинов) $\text{Log}(q\text{-value}) = -8,58$).
 4. Установлено, что с развитием бронхиальной астмы, коморбидной с аллергическим ринитом, а также бронхиальной астмы в сочетании с аллергическим ринитом и атопическим дерматитом, ассоциированы полиморфизмы rs906363 *AL590648.3/BATF3* ($p = 0,0061$) и rs7755224 *HLA* ($p = 0,0455$). С развитием изолированных аллергических заболеваний ассоциированы другие полиморфизмы: rs1837253 *AC010395.1/TSLP* ($p = 0,0295$), rs11742240 *IL7R/AC112204.3* ($p = 0,0325$) и rs1555926 *ZNF217* ($p = 0,0394$) ассоциирован с развитием бронхиальной астмы; rs2197415 *AC044784.1/LINC00709* ($p = 0,0285$) ассоциирован с развитием атопического дерматита.
 5. Установлено, что синтропия «бронхиальная астма и гипертоническая болезнь» отличается от соответствующих изолированных патологических состояний: полиморфные варианты генов *ANG/RNASE4* (rs1010461 ($p = 0,0024$), *LOC105376244/TLR4* (rs7038716 ($p = 0,0113$); rs7026297 ($p = 0,0299$); rs7025144 ($p = 0,0343$)), *ABTB2/CAT* (rs2022318 ($p = 0,0444$)) ассоциированы с синтропией «бронхиальная астма и гипертоническая болезнь»; с развитием бронхиальной астмы ассоциированы SNPs, регулирующие экспрессию генов *TLR4*

- (rs1927914 (p = 0,0397); rs1928298 (p = 0,0442)), *SERPINA1* (rs1980616 (p = 0,0462)), а с развитием гипертонической болезни – *ATXN2-AS/BRAP* (rs11065987 (p = 0,0076)); *CYP17A1/CNNM2/NT5C2* (rs11191582 p = 0,0419)); *CARD8* (rs11669386 (p = 0,0433)); *IL2RB* (rs2284033 (p = 0,0359)).
6. Выявлены ассоциации гаплотипов с развитием синтропии «бронхиальная астма и гипертоническая болезнь»: гаплотип T-C-T, образованный вариантами rs10465133, rs7025144, rs7860332 (p = 0,004); гаплотип A-G-C-A-T-C – rs11032655, rs2022318, rs7934463, rs12806377, rs11032695, rs10836230 (p = 0,005); T-C – rs11032699, rs11032700 (p = 0,046); гаплотип G-T-G-A-T-C-C-C-A-T – rs1535721, rs7949972, rs11032723, rs12797274, rs17269847, rs2420386, rs7126243, rs7130331, rs7130345, rs7938373 (p = 0,016).
 7. Гаплотипы гена *CAT* G-C-C-A-C-G-C-C-A-T и G-T-G-A-T-C-T-T-G-C, образованные вариантами rs1535721, rs7949972, rs11032723, rs12797274, rs17269847, rs2420386, rs7126243, rs7130331, rs7130345, rs7938373, ассоциированы с развитием изолированной бронхиальной астмы (p = 0,039 и p = 0,031 соответственно).
 8. Определены феномо-геномные особенности коморбидных фенотипов в зависимости от времени манифестации заболеваний. Фенотип «бронхиальная астма и гипертоническая болезнь» ассоциирован с полиморфными вариантами rs11590807 (*TRAF3IP3/C1orf74*) и rs1010461 (*ANG/RNASE4*), а фенотип «гипертоническая болезнь и бронхиальная астма» – с полиморфными вариантами rs11590807 (*TRAF3IP3/C1orf74*), rs769214 (*CIRIP3/CAT*), rs11032700, rs11032699, rs484214 и rs480575 (*CAT*).
 9. Установлено, что бронхиальная астма и туберкулез, несмотря на их фенотипическую дистанцированность, характеризуются значительным общим молекулярно-генетическим компонентом согласно трем критериям связанности заболеваний, включая количество общих белков (p = 0,0004), индекс Жаккара (p = 0,017) и меру meet/min (p = 0,0364). Выявлено, что с развитием как бронхиальной астмы, так и туберкулеза ассоциированы полиморфные варианты rs2239704 (*TNF/LTA*), rs2069705 (*IFNG*). Полиморфные варианты rs3760903 (*PIASY*), rs56061981 и rs4386624 (*CXCL10*) специфично ассоциированы с развитием туберкулеза, а rs12756687 (*PIAS3*), rs6737848 (*SOCS5*) и rs652625 (*TNFRSF1B*) – с развитием бронхиальной астмы.
 10. Установлено, что детерминированность изменения экспрессии гена *TNF* в мононуклеарных клетках периферической крови определяется генотипом ассоциированного с бронхиальной астмой и туберкулезом полиморфизма rs2239704 и стимулирующего агента, активирующего сигнальные пути, связанные с антибактериальным ответом и воспалительной реакцией (IFN- γ , LPS).
 11. Показано, что метафора «герменевтического круга», описывающая взаимосогласие в интерпретации, с одной стороны, и понимание – с другой, является полезной в отношении рассмотрения некоторых концептуальных «отдельностей» и феномена сочетания болезней у человека.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Брагина Е.Ю.**, Рудко А.А., Фрейдин М.Б., Салтыкова И.В., Ан А.Р., Гараева А.Ф., Конева Л.А., Мингареева К.В., Воробьева Н.А., Огородова Л.М., Пузырев В.П. Ассоциация полиморфизма генов Th1/Th2 поляризации иммунного ответа с иммунологически «полярными» заболеваниями (бронхиальная астма и туберкулез) // Медицинская генетика. – 2013. – № 11. – С. 40-43.
2. Ан А.Р., Рудко А.А., **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов цитокиновых сигналов с туберкулезом легких // Туберкулез и болезни легких. – 2013. – № 8. – С. 34-39.
3. Салтыкова И.В., Фрейдин М.Б., **Брагина Е.Ю.**, Огородова Л.М., Пузырев В.П. Ассоциация полиморфизма rs6737848 гена *SOCS5* с бронхиальной астмой // Вестник РАМН. – 2013. – № 7. – С. 53–56.
4. **Bragina E.Yu.**, Tiys E.S., Freidin M.B., Koneva L.A., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A., Kolchanov N.A., Puzyrev V.P. Insights into pathophysiology of dystropy through the analysis of gene networks: an example of bronchial asthma and tuberculosis // Immunogenetics. – 2014. – V. 66(7-8). – P. 457-465.
5. **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б. Молекулярно-генетические исследования коморбидности // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14(6). – С. 94-102.
6. **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Гараева А.Ф., Колоколова О.В., Жалсанова И.Ж., Пузырев В.П. Анализ генов цитокиновой сети в развитии «обратной» коморбидности для бронхиальной астмы и туберкулеза // Медицинская генетика. – 2017. – Т. 16(1). – С. 20-24.
7. Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., **Bragina E.Y.**, Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofestaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I., Ivanisenko V.A. Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks // BMC Medical Genomics. – 2018. – V. 11(Suppl 1). – P.15.
8. **Bragina E.Yu.**, Goncharova I.A., Garaeva A.F., Nemerov E.V., Babovskaya A.A., Karpov A.B., Semenova Y.V., Zhalsanova I.Z., Gomboeva D.E., Saik O.V., Zolotareva O.I., Ivanisenko V.A., Dosenko V. E., Hofestaedt R., Freidin M.B. Molecular Relationships between Bronchial Asthma and Hypertension as Comorbid Diseases // Journal of integrative bioinformatics. – 2018. – V. 15(4). – P. 20180052.
9. Shoshi A., Hofestädt R., Zolotareva O., Maier A., Friedrichs M., Ivanisenko V.A., Dosenko V.E., **Bragina E.Yu.** GenCoNet – a graph database for the analysis of comorbidities by gene networks // Journal of integrative bioinformatics. – 2018. – V. 15(4). – P. 20180049.
10. Drevytska T., Morhachov R., Tumanovska L., Portnichenko G., Nagibin V., Boldyriev O., Lapikova-Bryhinska T., Gurianova V., Dons'koi B., Ivanisenko V., **Bragina E.**, Hofestaedt R., Dosenko V. shRNA-induced knockdown of a bioinformatically predicted target IL10 influences functional parameters in spontaneously hypertensive rats with asthma // Journal of integrative bioinformatics. – 2018. – V. 15(4). – P. 20180053.
11. Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., **Bragina E.Yu.**, Freidin M.B., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Choyznzonov E.L., Hofestaedt R., Ivanisenko V.A. Search for new

- candidate genes involved in the comorbidity of asthma and hypertension based on automatic analysis of scientific literature // *Journal of integrative bioinformatics*. – 2018. – V. 15(4). – P. 20180054.
12. Zolotareva O., Saik O.V., Königs C., **Bragina E.Y.**, Goncharova I.A., Freidin M.B., Dosenko V.E., Ivanisenko V.A., & Hofestädt R. Comorbidity of asthma and hypertension may be mediated by shared genetic dysregulation and drug side effects // *Scientific reports*. – 2019. – V. 9(1). – P. 16302.
 13. Гончарова И.А., **Брагина Е.Ю.**, Жалсанова И.Ж., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е. Эффект полиморфизма генов *IL10* (rs1800872) и *CXCL10* (rs4386624, rs4256246) в развитии инфекционных заболеваний вирусной и бактериальной природы // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2019. – Т. 5(4). – С. 32-43.
 14. **Брагина Е.Ю.**, Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Жалсанова И.Ж., Гомбоева Д.Е., Немеров Е.В., Пузырев В.П. Гаплотипический анализ генов *CAT*, *TLR4* и *IL10* у больных бронхиальной астмой с сопутствующей артериальной гипертензией // *Сибирский научный медицинский журнал*. – 2019. – Т. 39(6). – С. 55-64.
 15. Гомбоева Д.Е., **Брагина Е.Ю.**, Назаренко М.С., Пузырев В.П. Обратная коморбидность между онкологическими заболеваниями и болезнью Гентингтона: обзор эпидемиологических и биологических доказательств // *Генетика*. – 2020. – Т. 56 (№ 3). – С. 260-271.
 16. **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б., Пузырёв В.П. Генетика синтропии «атопический марш» // *Сибирский научный медицинский журнал*. – 2020. – Т. 40(5). – С. 4-17.
 17. **Брагина Е.Ю.**, Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Жалсанова И.Ж., Гомбоева Д.Е., Бушуева О.Ю., Полоников А.В., Назаренко М.С., Панасенко А.В., Пузырев В.П. Молекулярный фенотип бронхиальной астмы в сочетании с артериальной гипертензией // *Медицинская генетика*. – 2020. – Т. 19(№ 8). – С. 87-89.
 18. Жалсанова И.Ж., **Брагина Е.Ю.**, Бабушкина Н.П., Тарасенко Н.В., Назаренко М.С., Пузырев В.П. Роль полиморфных вариантов генов *TNF* (rs1800629), *TNFB* (rs2239704) и *TNFRSF1B* (rs652625) в развитии аллергических и инфекционных заболеваний // *Медицинская генетика*. – 2020. – Т. 19(№ 8). – С. 90-91.
 19. Гончарова И.А., **Брагина Е.Ю.**, Жалсанова И.Ж., Фрейдин М.Б., Назаренко М.С. Регуляторный потенциал SNP-маркеров генов, ассоциированных с бронхиальной астмой, артериальной гипертензией и их коморбидным фенотипом // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2021. – Т. 25(8). – С. 855-863.
 20. **Брагина Е.Ю.**, Гончарова И.А., Жалсанова И.Ж., Немеров Е.В., Назаренко М.С., Фрейдин М.Б. Бронхиальная астма в структуре генетических связей синтропии сердечно-сосудистого континуума // *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины*. – 2021. – Т. 36(№ 4). – С. 52-61.
 21. **Брагина Е.Ю.**, Гончарова И.А., Жалсанова И.Ж., Немеров Е.В., Назаренко М.С., Фрейдин М.Б., Пузырев В.П. Генетическая коморбидность гипертонической болезни и бронхиальной астмы // *Артериальная гипертензия*. – 2022. – Т. 28(№ 1). – С. 87-95.
 22. **Брагина Е.Ю.**, Назаренко М.С., Пузырев В.П. Молекулярное сходство многофакторных и менделевских болезней // *Медицинская генетика*. – 2022. – Т. 21(№ 7). – С. 30-32.

23. **Брагина Е.Ю.**, Пузырев В.П. Генетическая канва герменевтики феномена сочетания болезней человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27(1). – С. 7-17.

Статьи в сборниках и материалах конференций:

24. **Bragina E.**, Koneva L., Tiys E., Freidin M., Ivanisenko V., Puzyrev V. Shared genetic factors in the pathogenesis of dystropic immune-mediated diseases // European Respiratory Journal (Abstracts from the 2013 European Respiratory Society Annual Congress). – 2014. – V. 42 (Suppl 57). – P. 1525.
25. **Брагина Е.Ю.**, Тийс Е.С., Фрейдин М.Б., Конева Л.А., Иванисенко В.А., Деменков П.С., Колчанов Н.А., Пузырев В.П. К проблеме дистропии: туберкулез и бронхиальная астма. // Генетика человека и патология. Проблемы эволюционной медицины: сборник научных трудов / под ред. В.А. Степанова. – Вып. 10. – Томск: Изд-во Печатная мануфактура, 2014. – С. 96-101.
26. **Брагина Е.Ю.**, Конева Л.А., Тийс Е.С., Фрейдин М.Б., Иванисенко В.А., Пузырев В.П. Методология поиска полиморфных вариантов генов, способствующих редкому сочетанию бронхиальной астмы и туберкулеза // Тезисы докладов VI съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) и ассоциированных генетических симпозиумов (г. Ростов-на-Дону, 15-20 июня 2014 г.) – С. 109.
27. **Bragina E.Yu.**, Freidin M.B., Tiys E.S., Koneva L.A., Ivanisenko V.A., Puzyrev V.P. The study of biological origin of rare co-existence of atopic asthma and tuberculosis // Abstract from the ninth International Conference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology – BGRS\SB-2014. – 2014. – P. 13.
28. Koneva L.A., Freidin M.B., **Bragina E.Yu.**, Puzyrev V.P, McEachin R.C. Modeling genetic influences on two diseases that are unusually rare in co-occurrence: bronchial asthma and pulmonary tuberculosis // Abstract from the ninth International Conference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology — BGRS\SB-2014. – 2014. – P. 34.
29. **Брагина Е.Ю.**, Тийс Е.С., Фрейдин М.Б., Конева Л.А., Иванисенко В.А., Пузырев В.П. Общие генетические факторы развития бронхиальной астмы и туберкулеза // Медицинская генетика. – 2015. –Т. 14. – №2 (152). – С. 29-30.
30. **Bragina E.**, Freidin M., Tiys E., Koneva L., Ivanisenko V., Puzyrev V. The investigate of the biological association between atopic bronchial asthma and tuberculosis // European Journal of Human Genetics (Abstracts from the 47th European Society of Human Genetics Conference). – 2015. – V. 23(Supp. 1) – P. 408 (J07.13).
31. **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Гараева А.Ф., Колоколова О.В. Исследование регуляторных полиморфных вариантов общих генов для бронхиальной астмы и туберкулеза // Сборник тезисов 3-ей Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии (Курск, 17-19 мая 2016). – С. 31-32.
32. **Bragina E.Yu.**, Freidin, M.B., Babushkina N.P., Garaeva A.F. and Kolokolova O.V. The study of regulatory polymorphic variants of shared candidate genes for asthma and tuberculosis // International Journal of Medical Biology, Ashdin Publishing International Journal of Medical Biology. – 2016. – V. 3. – P. 4-5.

33. Babushkina N.P., **Bragina E.Y.**, Freidin M.B., Garaeva A.F., Kolokolova O.V. The study of regulatory SNPs of the genes shared by asthma and tuberculosis // Abstract from The international Symposium systems biology and biomedicine (Sbiomed-2016). – 2016. – P. 20.
34. Жалсанова И.Ж., **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Гараева А.Ф., Колоколова О.В. Полиморфизм гена *IL10* (rs1800872) как фактор «обратной» коморбидности между бронхиальной астмой и туберкулезом // Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Молекулярная диагностика (г. Москва) / Под ред. В.И. Покровского, 2017. – Т. 2. – С. 125-126.
35. **Брагина Е.Ю.**, Бабушкина Н.П., Жалсанова И.Ж., Фрейдин М.Б., Гараева А.Ф., Колоколова О.В., Пузырев В.П. Межгенные взаимодействия при бронхиальной астме и туберкулезе легких // Генетика человека и патология: сборник научных трудов / Под редакцией В.А. Степанова. – Вып. 11. – Томск: Изд-во Печатная мануфактура, 2017. – С. 68-69.
36. Жалсанова И.Ж., **Брагина Е.Ю.**, Фрейдин М.Б., Гараева А.Ф., Колоколова О.В., Гомбоева Д.Е., Бабовская А.А., Пузырев В.П. Исследование генетических факторов в развитии дистропных болезней на примере бронхиальной астмы и туберкулеза // Сборник научных трудов Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике / Под ред. А.Б. Масленникова. – Вып. 27. – Новосибирск: Изд-во Академиздат, 2018. – С. 36-47.
37. Бабовская А.А., Жалсанова И.Ж., **Брагина Е.Ю.**, Бабушкина Н.П., Колоколова О.В. Генетические факторы подверженности микобактериальной инфекции // Медицинский алфавит. – 2018. – Т. 2. – № 19 (356). – С. 5-6.
38. Zhalsanova I., **Bragina E.**, Freidin M., Babushkina N., Garaeva A., Kolokolova O., Gombueva D., Tarasenko N., Puzyrev V. The role of genes *IL10* (rs1800872) and *TNF* (rs2239704) in the pathogenesis of bronchial asthma and tuberculosis // European Respiratory Journal (Abstracts from the 2018 European Respiratory Society Annual Congress). – 2018. – V. 52(suppl 62). – PA4219.
39. **Bragina E.Yu.**, Freidin M.B., Goncharova I.A., Saik O.V., Zolotareva O.I., Ivanisenko V.A., Dosenko V.E., Hofestaedt R. Convergent molecular mechanisms of bronchial asthma and hypertension // Электронный сборник материалов V Международной научно-практической конференции Современные биотехнологии для науки и практики, приуроченной к международному дню ДНК (г. Санкт-Петербург, 26-27 апреля 2018 г.). – С. 4.
40. **Bragina E.Yu.**, Freidin M.B., Goncharova I.A., Saik O.V., Zolotareva O.I., Ivanisenko V.A., Dosenko V.E., Hofestaedt R. A search for molecular relationships between bronchial asthma and hypertension as an example of comorbid diseases // Abstract from the Eleventh International Conference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology – BGRS\SB-2018. – 2018. – P. 30.
41. Zolotareva O., Shoshi A., Hofestädt R., Maier A., Ivanisenko V., Dosenko V., **Bragina E.** Gene network analysis of complex diseases using GenCoNet // Abstract from the 3rd International Symposium Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology – MM-HPC-BBB-2018. – 2018. – P.76.

42. Жалсанова И.Ж., Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Гараева А.Ф., Колоколова О.В., Тарасенко Н.В., Гомбоева Д.Е., Пузырев В.П. Функциональные особенности вариантов генов *IL10* (rs1800872) и *TNF* (rs2239704), ассоциированных с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза // Сборник материалов конгресса молодых ученых Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины (г. Томск, 24–25 мая 2018 г.) / под ред. Е.Л. Чойнзонова, Э.В. Галажинского, С.В. Попова, Н.А. Бохана, В.А. Степанова, В.В. Жданова; Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томский государственный университет. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2018. – С. 88-90.
43. Гладкова К.А. Радаева Т.В., Николаев А.А., Пантелеев А.В. Ненашева Т.А., Брагина Е.Ю., Лядова И.В. Полиморфизм генов фактора некроза опухоли (*TNF*) и рецептора фактора некроза опухоли (*TNFRSF1B*) у больных туберкулезом легких // Сборник трудов российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом. Современные инновационные технологии в эпидемиологии, диагностике и лечении туберкулеза взрослых и детей (г. Москва, 22-23 марта 2018 г.). – 2018. – С. 134-135.
44. Bragina E.Yu., Freidin M.B., Saik O.V., Zolotareva O., Goncharova I.A., Ivanisenko V.A., Dosenko V.E., Hofstaedt R. Identification of the genetic factors underlying comorbidity between bronchial asthma and hypertension // European Journal of Human Genetics (Abstracts from the 50th European Society of Human Genetics. – 2019. – V. 27. – P. 1035-1036.
45. Жалсанова И.Ж., Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Пузырев В.П. Общность ассоциаций *TNFB* (rs2239704) и *TNFRSF1B* (rs652625) с развитием бронхиальной астмы и туберкулеза лёгких // Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции (г. Ростов-на-Дону, 26–29 сентября 2019 г.). – С. 36-37.
46. Брагина Е.Ю., Фрейдин М.Б., Бабушкина Н.П., Жалсанова И.Ж., Гончарова И.А., Иванисенко В.А., Dosenko V.E., Hofstaedt R., Назаренко М.С., Пузырев В.П. Феномен сочетанных болезней: от идентификации механизмов к поиску лекарственных мишеней // Сборник тезисов VII съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированных симпозиумов (г. Санкт-Петербург, 18-22 июня 2019 г.). – 2019. – С. 148.
47. Hofstaedt R, Bragina E., Dosenko V. GenCoNet: Medical Information System to support the treatment of co-morbid diseases // Abstract from the 12th International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology – BGRS\SB-2020. – 2020. – P. 434-435.
48. Брагина Е.Ю., Пузырёв В.П. Поиск генов коморбидности бронхиальной астмы и сердечно-сосудистых заболеваний // Материалы конференции Генетические ресурсы и генетические технологии для развития северных территорий (г. Санкт-Петербург, 20-22 декабря 2021 г.). – С. 56-57.
49. Zhalsanova I., Bragina E., Babushkina N., Tarasenko N., Freidin M., Puzyrev V. Functional consequences of rs1800629 *TNF* gene associated with asthma and tuberculosis

development // European Journal of Human Genetics (Abstracts from the 54th European Society of Human Genetics Conference: e-Posters). – 2022. – V.30 (Suppl. 1). – P.153. (P 03.047.C).

50. **Bragina E.Yu.**, Goncharova I.A., Zhalsanova I.Zh., Nemerov E.V., Nazarenko M.S., Freidin M.B., Puzyrev V.P. Understanding the role of genetics in comorbidity // Abstract from the 13th International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology – BGRS/SB-2022. – 2022. – P. 394.
51. **Bragina E.Yu.**, Puzyrev V.P. The diseases connection phenomenon: the role of genetic factors in the development of syntropy and dystropy // Abstract from the 14th International Multiconference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology – BGRS/SB-2024. – 2024. – P. 769-772.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – атопический дерматит
 АР – аллергический ринит
 БА – бронхиальная астма
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
 ГБ – гипертоническая болезнь
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
 М.Е. – Международная единица
 мРНК – матричная РНК
 МФЗ – многофакторное заболевание
 ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
 ПЦР – полимеразная цепная реакция
 p – достигнутый уровень статистической значимости различий
 РНК – рибонуклеиновая кислота
 ТБ – туберкулез
 ЦНС – центральная нервная система
 95 % CI – 95 % доверительный интервал
 ACS – острый коронарный синдром
 АИТ – аутоиммунный тиреоидит
 AlzD – болезнь Альцгеймера
 ANDCell – Associative Networks Discovery in Cells, инструмент для реконструкции генных сетей
 Ather – атеросклероз
 БА – бронхиальная астма
 CAD – ишемическая болезнь сердца
 CD – болезнь Крона
 CD2 – сахарный диабет
 Cel – целиакия
 COPD – хроническая обструктивная болезнь легких
 Derm – дерматит
 eQTL – локусы, влияющие на уровень экспрессии
 F – фиброз
 GABRIEL – международный консорциум исследования генетических и средовых факторов развития бронхиальной астмы
 GO – термины генной онтологии
 GWAS – широкогеномные исследования ассоциаций
 HL – гиперлипидемия

Hyper – артериальная гипертензия

ID – уникальный идентификатор

JI – мера общности П. Жаккара (Jaccard Index)

Log(q-value) – достигнутый уровень значимости различий (p) с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественные сравнения в логарифмическом формате

LogP – достигнутый уровень значимости различий (p) в логарифмическом формате

LPS – липополисахарид

LW – потеря массы тела

MeSH – Medical Subject Headings, тезаурус

MI – инфаркт миокарда

Ob – ожирение

OMIM – онлайн каталог Mendelian Inheritance in Man, MIM

OR – отношение шансов

Ost – остеопороз

Ps – псориаз

R – ринит

RR – относительный риск

Sch – шизофрения

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

TDM – трегалоза-6,6-ди-миколат

TDT – Transmission/Disequilibrium Test

Th1 – Т-хелперы первого типа

Th2-T – хелперы второго типа

Tub – туберкулез легких

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10

Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03

д-ру мед. наук Назаренко М.С.

e-mail: maria-nazarenko@medgenetics.ru