

На правах рукописи

Кофиади Илья Андреевич

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАРАЖЕНИЮ ВИЧ И
РАЗВИТИЮ СПИД В ПОПУЛЯЦИЯХ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ
ГОСУДАРСТВ**

14.00.36 - аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Москва, 2008

Работа выполнена в ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России» и ЗАО «НПФ ДНК-Технология».

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор Алексеев Леонид Петрович

Кандидат биологических наук Ребриков Денис Владимирович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор Кадагидзе Заира Григорьевна

Доктор биологических наук Филатов Александр Васильевич

Ведущая организация:

Научно исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова РАМН

Защита состоится 23 апреля 2008 года в 13.00 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.017.01 в ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России» по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, дом 24, корп. 2.

Ученый секретарь совета,
Доктор медицинских наук

Сеславина Л.С.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Пандемия ВИЧ остается одной из самых серьезных проблем здравоохранения в области инфекционных заболеваний. В мире насчитывается около 33 миллионов человек живущих с ВИЧ/СПИД и в день происходит примерно 6800 новых заражений [UNAIDS, 2007]. Общая иммуносупрессия, вызываемая инфекцией, повышает риск развития инфекционных и онкологических заболеваний и, в подавляющем большинстве случаев, приводит к летальному исходу через 10-12 лет после заражения. Тем не менее, динамика развития заболевания может варьировать на индивидуальном уровне. В немалой степени, на устойчивость к ВИЧ и предрасположенность человека к развитию СПИД влияет аллельное состояние ряда генов. В том числе, к ним относятся гены рецепторов хемокинов CCR5 и CCR2 и ген хемокина SDF1 [Fauci A., et al., 1996; Dean M., et al., 1996]. Наиболее достоверная ассоциация генотипа с устойчивостью или восприимчивостью к ВИЧ-инфекции показана для аллелей *CCR5delta32* (номер полиморфизма в базе данных NCBI - rs333), *CCR2-64I* (rs1799864) и *SDF1-3'A* (rs1801157).

Защитный эффект полиморфизмов *CCR5delta32* и *CCR2-64I* носит доминантный, а *SDF1-3'A* – рецессивный характер [Winkler C., et al., 1998]. Эффект проявляется в повышенной устойчивости носителей определенных комбинаций аллелей указанных генов к развитию симптомов СПИД. Зная частоты встречаемости трехлокусных генотипов (для генов *CCR5*, *CCR2* и *SDF1*) и общие для представителей различных этнических групп коэффициенты относительного риска развития СПИД (PP) и смерти в результате СПИД (PC), можно оценить относительную опасность развития СПИД (OOP) и смерти в результате СПИД (OOC) для данной популяции. Применимость этого подхода подтверждена результатами пятнадцатилетнего исследования нескольких эпидемиологических когорт, включающих здоровых, относящихся к группе повышенного риска, и ВИЧ-

инфицированных представителей различных этнических групп с известными генотипами по трем перечисленным выше локусам [по данным Winkler C., et al., 1998].

В человеческих расах и популяциях защитные аллели представлены гетерогенно, поэтому выяснение особенностей их распределения является одним из важных параметров, характеризующих эпидемиологические особенности данного региона или этнической группы.

Сравнительный популяционно-генетический анализ - наиболее адекватный способ оценки вклада наследственной составляющей в формирование устойчивости или восприимчивости популяций к инфекционному фактору. Современные методы молекулярно-генетического анализа и существующие представления о структурно-функциональной организации генома многоклеточных организмов позволяют вплотную подойти к выяснению закономерностей влияния отдельных полиморфизмов на устойчивость или восприимчивость человека к ВИЧ.

Цель исследования

Охарактеризовать 10 популяций Российской Федерации и сопредельных государств с точки зрения генетической устойчивости к заражению ВИЧ и развитию СПИД.

Задачи исследования

1. Разработать комплекс ПЦР-тест-систем для определения аллельного состояния генов *CCR5*, *CCR2*, *SDF*, ассоциированного с повышенной устойчивостью или восприимчивостью к ВИЧ-инфекции.
2. С помощью разработанных тест-систем установить частоты исследуемых аллелей у здоровых (без известной истории ВИЧ/СПИД) представителей 10 популяций.
3. Охарактеризовать особенности распределения аллелей и гаплотипов исследуемых полиморфных локусов.
4. Оценить относительную опасность развития СПИД и смерти в результате СПИД в исследованных популяциях.

5. Оценить влияние генетического фактора (в пределах исследуемых полиморфизмов) на динамику основных эпидемиологических показателей в изученных регионах.

Новизна исследования

Впервые проведен комплексный анализ полиморфизма генов *CCR5*, *CCR2*, и *SDF1* в 10 популяциях, проживающих на территории России и сопредельных государств, и дана характеристика их генетической структуры. Оценена доля предрасположенных (не несущих ни одного протективного генотипа) индивидуумов. Оценена относительная опасность развития СПИД и смерти в результате СПИД в исследованных популяциях.

Практическая значимость

Разработаны методологические подходы для эффективного генотипирования.

Разработаны и внедрены в лабораторную практику тест-системы для определения полиморфизмов *CCR5delta32*, *CCR2-64I* и *SDF1-3'A* методом ПЦР в режиме «реального времени». Методики просты в использовании, экономичны, обладают высокой пропускной способностью и полностью адаптированы к производимому в Российской Федерации оборудованию. Это создает потенциал для использования данных методов в клинической практике, в качестве инструмента для оценки предрасположенности человека к ВИЧ-инфекции, и динамики развития СПИД у ВИЧ-инфицированных.

Разработанные методики могут быть использованы в учебном процессе при подготовке специалистов медицинского и биологического профиля.

Полученные данные могут служить теоретической основой при рассмотрении особенностей распространения ВИЧ-инфекции в исследованных популяциях, а так же при прогнозировании дальнейшего развития эпидемии.

Характеристика геномного полиморфизма в исследованных популяциях имеет общее популяционно-генетическое значение и служит вкладом в развитие фундаментальной науки.

Публикации и апробация работы

Диссертация апробирована на заседании секции № 2 Ученого совета ГНЦ «Института иммунологии ФМБА России» от 14 декабря 2007 г. и рекомендована к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «14.00.36 - аллергология и иммунология». Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на двух отечественных и двух международных конференциях: XVIII зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии (2006 г.), 16 европейском конгрессе по иммунологии (Париж, Франция 2006 г.), XI всероссийском научном форуме с международным участием имени В.И. Иоффе (2007 г.), 21 европейской конференции по иммуногенетике и гистосовместимости (Барселона, Испания, 2007 г.)

Материалы диссертации изложены в 9 публикациях, в том числе: 4 журналах, рекомендованных ВАК для опубликования научных результатов диссертационных работ на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы были обследованы 960 здоровых (не имеющих известной истории ВИЧ/СПИД), взрослых представителей 10 этнических групп (по 96 человек для каждой группы), не связанных кровным родством, проживающих в различных регионах России, Украины, Казахстана, Киргизстана и Молдовы (рис. 1). Образцы крови были получены из разных источников: биоматериал от гагаузов (Молдова), украинцев из Львовской области и чеченцев (республика Чечня), полученный в результате этнографических и медико-генетических экспедиций были переданы д.б.н. Балановской Е.В. (Медико-генетический научный центр РАМН);

биоматериал от русских поморов (Архангельская область), передан д.м.н. Евсеевой И.В. (Северный госмедуниверситет, г. Архангельск); биоматериал от удмуртов, собранный в различных районах республики Удмуртия передали к.м.н Поздеева О.С. и Ганичева Л.Л. (Ижевская государственная медакадемия); биоматериал от русских из Вологодской области передан Кашининым М.Н. (Вологодская областная больница); биоматериал от татар (потомков переселенных в годы отечественной войны из Казани) был собран в Кировской области и передан проф. Зайцевой Г.А. (Кировский НИИ гематологии и переливания крови); биоматериал от тувинцев из разных районов республики Тыва был передан д.м.н. Осокиной И.В. (Институт медицинских проблем Севера СО РАМН).

Сотрудниками ГНЦ «Института иммунологии ФМБА России» был собран биоматериал от казахов (Актюбинская область, Казахстан) и киргизов из разных районов Киргизстана.

По географическому принципу выбранные популяции можно сгруппировать в восточно-европейскую (русские, украинцы, гагаузы, и субэтническая группа поморов), центрально-азиатскую (казахи, киргизы и тувинцы) и Волго-Уральскую (татары и удмурты) группы. Кроме того, в исследование была включена популяция чеченцев, представляющая северо-кавказский регион.

Очистку ДНК проводили методом высаливания по стандартной процедуре [Miller S.A., et al., 1988].

Генотипирование образцов проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией накопления продуктов реакции «в реальном времени» (точность использованных систем была подтверждена повторным генотипированием выборки образцов методом секвенирования по Сэнгеру) [Sanger F., et al., 1975]. Для каждого из аллель-специфичных праймеров проводили отдельную реакцию. Каждый образец тестировали в двух повторностях. Визуализацию накопления продуктов ПЦР проводили с использованием линейных разрушаемых

гибридизационных проб. ПЦР проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) по следующей программе: 94°C – 10 с., 64°C – 20 с., 72°C – 10 с. в течение 40 циклов, с измерением флуоресценции при 64°C.



Рисунок 1. Географическое расположение исследованных популяций.

1. поморы, 2. русские (Вологодская область), 3. гагаузы, 4. украинцы, 5. татары, 6. удмурты, 7. чеченцы, 8. казахи, 9. киргизы, 10. тувинцы.

Статистическая обработка данных

Частоту аллелей вычисляли по формуле:

$$f = n/2N,$$

где n – встречаемость аллеля. Отклонение от теоретически ожидаемого распределения оценивали методом χ^2 ($p > 0,05$). Оценку ООР и ООС в исследованных популяциях проводили на основании коэффициентов, предложенных Su B. с соавторами [Su B., et al., 2000]. 27 возможных генотипов по трем полиморфным локусам, в соответствии с данными литературы, разделили на 4 группы. Для каждой группы использовали свой коэффициент относительного риска развития СПИДа и коэффициент

смерти в результате СПИДа (табл. 1). Расчет ООР и ООС проводили по формуле:

$$OOR(OOC) = \sum w_i p_i,$$

где p_i – частота встречаемости данной комбинации аллелей, а w_i – коэффициент ОРР (относительного риска развития СПИД) или ОРС (относительного риска смерти в результате СПИД) для данной группы.

Таблица 1. Возможные варианты генотипов по трем исследованным локусам, объединенные в четыре группы, каждой из которых соответствует общий коэффициент относительного риска развития СПИД (РР) и смерти в результате СПИД (РС). А, В и С – не протективные аллели генов *CCR5*, *CCR2*, и *SDF1*, соответственно; а, b и с – протективные аллели соответствующих генов.

Генотип	Число генотипов	РР	РС
ААВВСС-	2	1.0	1.0
a-b-C-	16	0.65	0.6
a-BBC-			
ААb-C-			
ААВВсс	1	0.63	0.23
a-b-cc	8	0.55	0.0
a-BBcc			
ААb-cc			

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработка лабораторного варианта тест-систем для определения аллелей *CCR5delta32*, *CCR2-64I* и *SDF1* методом ПЦР «в реальном времени».

В ходе работы созданы тест-системы для определения аллелей *CCR5delta32*, *CCR2-64I* и *SDF1-3'A* в геноме человека методом ПЦР «в реальном времени». Регистрация накопления ДНК в ходе реакции позволяет избежать отдельной стадии определения результатов, исключить

загрязнение лаборатории продуктами реакции, проводить количественный анализ нуклеиновых кислот.

Из существующего разнообразия флуоресцентных методик нами был выбран наиболее эффективный, на наш взгляд, метод определения полиморфизмов с помощью аллель-специфичной ПЦР. Для идентификации аллелей проводили ПЦР с праймерами, каждый из которых полностью совпадает только с одним из вариантов последовательности. Варибельный нуклеотид располагали в 3'-концевой части аллель-специфичного праймера. Условия реакции подбирали так, чтобы максимизировать разницу в эффективности удлинения «правильно» и «неправильно» гибридизованного праймера. Таким образом, если анализируемый образец содержит только один вариант последовательности (то есть гомозиготен по данному полиморфизму), продукт, синтезируемый с полностью комплементарного матрице праймера, образуется в ПЦР существенно раньше, нежели продукт с частично некомплементарного праймера (рис. 2А). Если же анализируют гетерозиготный образец, и тот и другой праймер сработают примерно одинаково (рис. 2Б). Регистрацию сигнала осуществляли при помощи линейных олигонуклеотидных проб, несущих молекулы флуорофора и гасителя. В данном случае пробы применяли только для проявления накопления ДНК в ходе ПЦР, разделение же аллелей происходило за счет аллель-специфичных праймеров. Такой подход позволил существенно упростить условия проведения реакции в части подбора концентрации матричной ДНК. Получаемые в результате реакции графики накопления ДНК можно однозначно трактовать даже в том случае, если к моменту окончания реакции продукт образовался во всех пробирках.

Использованный нами подход продемонстрировал высокую точность анализа и достаточную пропускную способность.

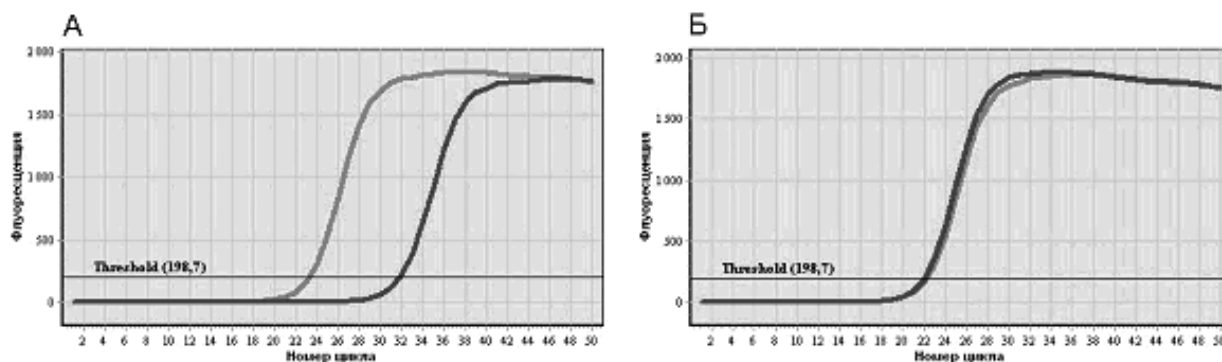


Рисунок 2. Графики накопления ДНК, полученные с помощью детектирующего амплификатора ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология»). А – результат исследования гомозиготного образца. Темная кривая соответствует накоплению продукта реакции с частично некомплементарного праймера; Б – результат исследования гетерозиготного образца.

2. Генотипирование образцов.

С помощью разработанных тест-систем были определены генотипы представителей 10 исследованных популяций по трем полиморфным локусам: *CCR5delta32*, *CCR2-64I* и *SDF1-3'A*. Результаты приведены в таблице 3.

3. Проверка соотношения Харди-Вайнберга для исследованных полиморфизмов.

Селективный отбор в отношении индивидуумов, несущих защитный генотип, может влиять на представленность аллелей в популяции. Для проверки этой гипотезы сравнивали полученные результаты с равновесным распределением Харди-Вайнберга. Для сравнения использовали критерий χ^2

Для 10 популяций отклонения частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга были незначимы на 5% уровне значимости (табл. 2). Эмпирически установленные частоты генотипов аллелей *CCR5delta32*, *CCR2-64I* и *SDF1-3'A* соответствовали распределению Харди-Вайнберга.

4. Изучение особенностей частотного распределения аллелей генов *CCR5*, *CCR2*, и *SDF1* в исследованных популяциях.

1.1 Распределение аллелей *CCR5delta32*

Частоты *CCR5delta32* представлены на рисунке 4.

Аллель *CCR5delta32* наиболее представлен в выборке поморов. Его частота достоверно выше, чем в других, изученных в данной работе выборках. Кроме того, частота аллеля в популяции русских поморов превышает частоты для изученных ранее популяций северных регионов Западной и Восточной Европы [Кожекбаева Ж.М., и др., 2004]. Распределение частот варианта *CCR5delta32* характеризуется отрицательным градиентом в направлении с севера Европы на юго-восток, что может быть связано с северным происхождением этого аллеля. Результаты, полученные в данной работе, подтверждают эту гипотезу (рис.3).

Аллель *CCR5delta32* наименее представлен в популяции тувинцев, казахов, киргизов и чеченцев (центрально-азиатская и северо-кавказская группы). Казахи и киргизы принадлежат южно-сибирской этнической группе - промежуточной между европеоидной и монголоидной расами, а тувинцы являются представителями монголоидной расы. В этих случаях полученные нами данные соотносятся с проводимыми ранее исследованиями, демонстрирующими низкую распространенность полиморфизма *CCR5delta32* в азиатских популяциях [Su B., et al., 2000].

На границах ареала монголоидной расы имеются плавные переходы в европеоидную, уральскую и южносибирскую расы. Примесь монголоидной составляющей в южных популяциях большой европеоидной расы (чеченцы) и переходной уральской (туранский тип) группе (татары, удмурты) могла повлиять на формирование генофонда, характеризующегося пониженной представленностью аллеля *CCR5delta32* по сравнению с популяциями восточно-европейского региона.

Аллель *CCR5delta32* достаточно равномерно распространен в популяциях украинцев, русских и гагаузов (восточно-европейская группа). Эти народы принадлежат славянской (русские, украинцы) и тюркской (гагаузы) языковой группе большой европеоидной расы. В изученных нами восточно-европейских популяциях частота аллеля *CCR5delta32* повышена, что может указывать на влияние притока генов с севера Европы, где

находится место происхождения данной мутации и с востока, где ее частота также высока. Такое распределение частот аллеля подтверждает гипотезу о преобладающей роли Европейских генов, в формировании генофонда населения восточной Европы. Постепенное замещение генов автохтонного и азиатского происхождения, сделало генофонды Кавказа и малой Азии чужеродными, в геногеографическом плане, по отношению к европейскому генофонду [Лимборская С.А., и др., 2002]. Таким образом, гетерогенность в распределении протективного аллеля *CCR5delta32* на территории изученных регионов связана, в первую очередь, с участием европеоидного и монголоидного компонентов в этногенезе народов, проживающих на территории России. Полученные нами результаты подтверждают и дополняют существующие данные молекулярно-генетического анализа пространственной структуры генофонда восточно-европейских и центрально-азиатских народов.

Таблица 2. Значения $\chi^2(p)$ для исследованных популяций

Популяция	<i>CCR5</i>	<i>CCR2</i>	<i>SDF1</i>
Поморы	0.01(0.92)	1.17(0.28)	0.01(0.92)
Вологодцы	1.5(0.22)	0.8(0.37)	0.01(0.92)
Гагаузы	0.36(0.55)	0.26(0.61)	0.69(0.4)
Украинцы	0.27(0.61)	1.45(0.23)	0.37(0.54)
Татары	0.7(0.40)	0.32(0.57)	2.8(0.09)
Удмурты	0.54(0.46)	0.67(0.41)	0.21(0.65)
Чеченцы	0.05(0.82)	2.56(0.11)	2.73(0.1)
Казахи	0.12(0.73)	0.63(0.43)	0.11(0.74)
Киргизы	0.15(0.7)	0.25(0.62)	1.77(0.18)
Тувинцы	0.01(0.92)	0,22(0.64)	0.01(0.92)

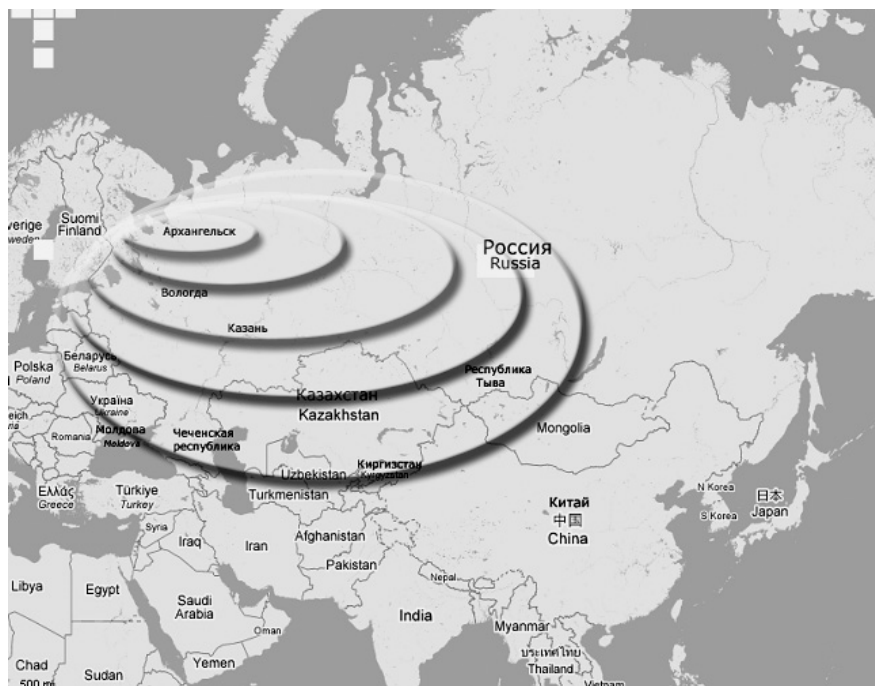


Рисунок 3. Распределение частот аллеля *CCR5delta32* демонстрирует клинальную изменчивость в направлении с севера на юго-восток.

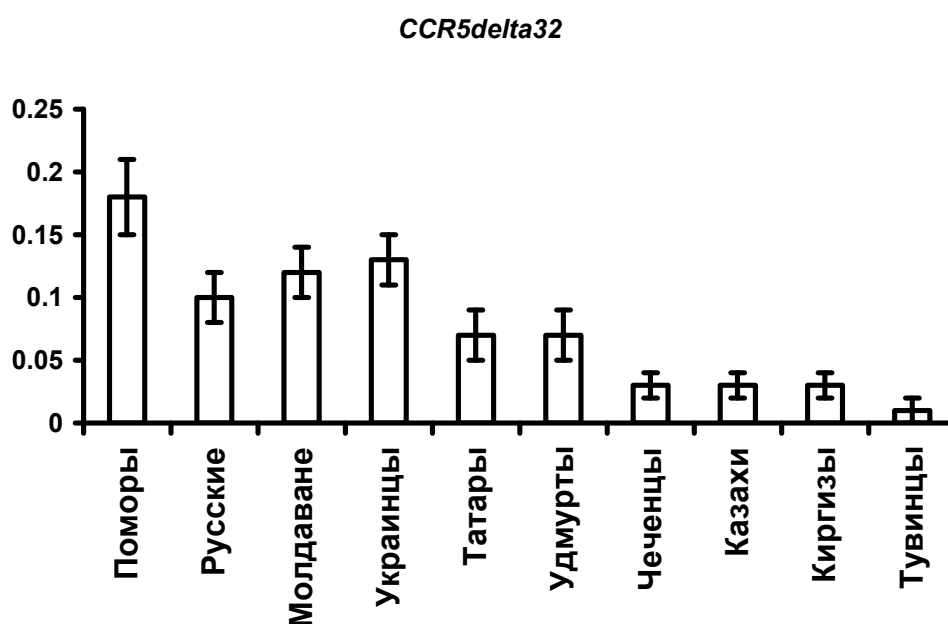


Рисунок 4. Распределение частот аллеля *CCR5delta32* в исследованных популяциях.

4.2 Распределение частот аллеля *CCR2-64I*

В отношении аллеля *CCR2-64I* нами были обнаружены достоверные отличия для Чеченцев, Казахов и Киргизов (северо-кавказская и центрально-азиатская группы) относительно других рассмотренных групп (рис. 5, 6).

В пределах восточно-европейской и Волго-Уральской этнографических групп обнаружены достоверные отличия для гагаузов относительно других популяций. Эти данные коррелируют с данными о миграционных потоках со стороны южных (Греция, Болгария) регионов Европы, где частота аллеля *CCR2-64I* демонстрирует повышенные значения. Значимых отличий в других этнических группах восточно-европейского региона обнаружено не было.

Отдельного упоминания стоит рассмотренная выборка из популяции Тувинцев. Здесь частота аллеля *CCR2-64I* зафиксирована на самом низком уровне. Причиной этому могла послужить географическая изолированность республики. Полученные нами данные позволяют предположить, что формирование генофонда тувинской популяции находилось под влиянием миграционных потоков, проникавших на территорию восточной Сибири из южных областей азиатского региона, где частота полиморфизма *CCR2-64I* ниже, относительно центральной Азии.



Рисунок 5. Распределение частот аллеля *CCR2-64I* на территории изученного региона. Повышенная частота характерна для в центрально-азиатских популяций.

CCR2-64I

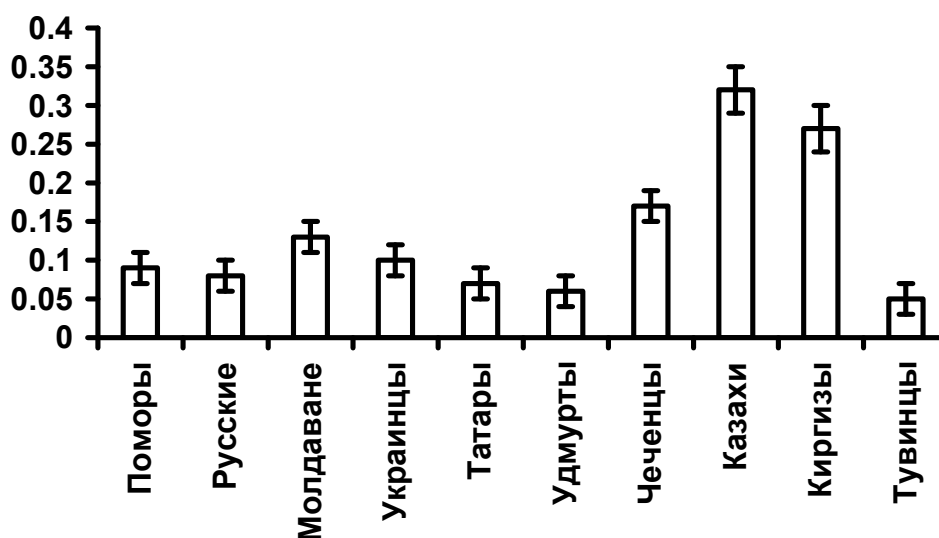


Рисунок 6. Распределение частот аллеля *CCR2-64I* в исследованных популяциях.

4.3 Распределение частот аллеля *SDF1-3'A*

Аллель *SDF1-3'A* в пределах практически всех исследованных популяций распространен равномерно (рис. 7). Обнаруженные отличия не достоверны и не позволяют выявить тенденций в его распространенности. Единственное значимое отличие отмечено нами для популяции гагаузов, где частота аллеля достоверно выше, чем у представителей популяций Украины и европейского региона России. К сожалению, в доступной литературе отсутствуют сведения о представленности варианта *SDF1-3'A* на территории Европы и ближневосточного региона и мы не можем делать предположений о путях его распространения.

Однако если сопоставить данные по частоте аллелей *CCR2-64I* и *SDF1-3'A* с основными путями миграции в Азиатском регионе, видно, что изменение частот аллелей совпадает с направлением миграционных потоков. По одной из существующих на сегодняшний день гипотез, современные люди попали на территорию центральной Азии примерно 50000-70000 лет назад с юга, вероятно из юговосточной Азии (где частота аллеля *SDF1-3'A* высокая), и в дальнейшем распространились на север Азии. Вместе с тем, последующие 7000 лет миграции на территории Китая были направлены с севера на юг – из области с высокой частотой *CCR2-64I*.

Противоположная направленность в распределении частот протективных аллелей *CCR2-64I* и *SDF1-3'A* на территории азиатского региона отчасти подтверждает эту гипотезу.

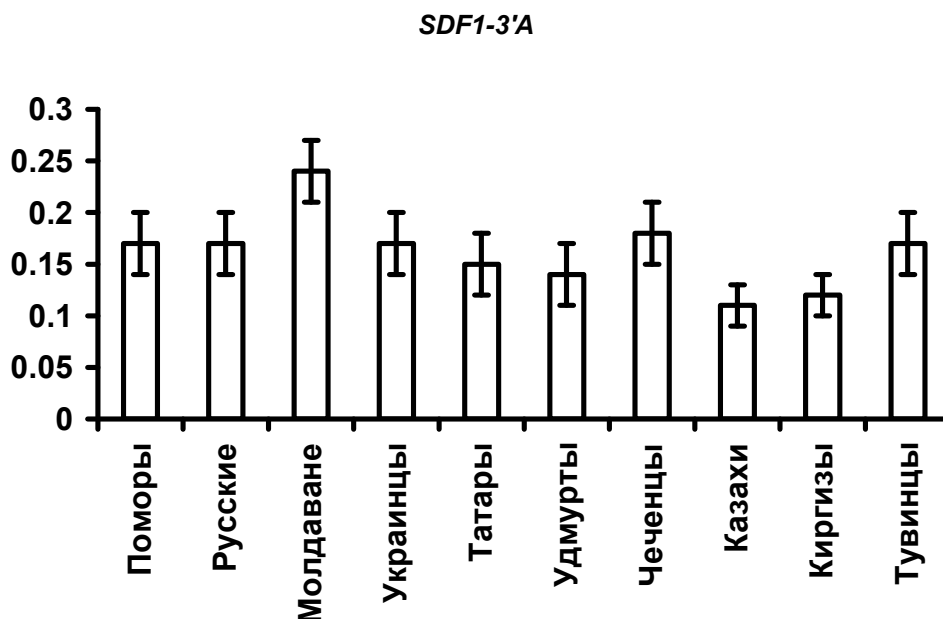


Рисунок 7. Распределение частот аллеля *SDF1-3'A* в исследованных популяциях.

5. Распределение протективных генотипов

Распределение генотипов в изученных популяциях по каждому локусу представлено в таблице 3.

При анализе распределения протективных генотипов было выявлено 3%, 2%, 2% и 1% индивидуумов, гомозиготных по аллелю *CCR5delta32*, в популяциях поморов, гагаузов, украинцев и в татар, соответственно. Показано, что носители такого генотипа практически не восприимчивы к ВИЧ-инфекции при половом способе передачи вируса [Dean M., et al., 1996].

Гомозиготы по аллелю *CCR2-64I* не найдены среди поморов, русских из Вологодской области, татар и тувинцев. Показано, что, как у гомозигот, так и у гетерозигот по аллелю *CCR2-64I* пролонгирован период между сероконверсией и проявлением симптомов СПИД, однако аллель не влияет на продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных с симптомами СПИД [Ioannidis J.P., et al., 2001].

Гомозиготы по *SDF1-3'A* обнаружены во всех популяциях кроме киргизов, чеченцев и татар. Протективный эффект этой мутации, в отличие от предыдущих двух, рецессивный и ассоциирован с увеличением продолжительности жизни ВИЧ-инфицированных с симптомами СПИД. Наибольшее снижение риска связано с сочетанием гомозиготности по *SDF1-3'A* и наличием хотя бы одного протективного аллеля по генам *CCR2* и *CCR5* [Winkler C., et al., 1998].

Таблица 3. Частоты генотипов по трем полиморфным локусам.

Популяция	n	Частота генотипов (%) <i>CCR5</i>			Частота генотипов (%) <i>CCR2</i>			Частота генотипов (%) <i>SDF1</i>		
		+/+	+/ <i>del</i>	<i>del/del</i>	G/G	G/A	A/A	G/G	G/A	A/A
Поморы	96	66,7	30,2	3,1	82.3	17.7	0	68.8	28.1	3.1
Вологодцы	96	79.2	21.0	0	83.3	16.7	0	68.8	28.1	3.1
Гагаузы	96	78.1	19.8	2.1	76.0	22.9	1.1	59.4	33.3	7.3
Украинцы	96	77.1	20.8	2.1	82.3	15.6	2.1	67.7	30.2	2.1
Татары	96	87.5	11.5	1.0	88.5	11.5	0	71.9	28.1	0
Удмурты	96	86.5	13.5	0	87.5	11.5	1.0	71.9	26.0	2.1
Чеченцы	96	93.7	6.3	0	71.9	22.9	5.2	63.5	36.5	0
Казахи	96	93.7	6.3	0	44.8	46.9	8.3	78.1	20.8	1.1
Киргизы	96	94.8	5.2	0	54.2	37.5	8.3	76.1	23.9	0
Тувинцы	96	97.9	2.1	0	90.6	9.4	0	68.8	28.1	3.1

6. Оценка доли предрасположенных индивидуумов

Важной оценочной характеристикой при определении динамики развития эпидемии в популяции служит доля предрасположенных (не несущих ни одного протективного генотипа) индивидуумов. Наибольшее количество незащищенных генотипов обнаружено в популяции Тувинцев, наименьшее – в центрально-азиатских популяциях (казахи, киргизы) и в популяции поморов (рис. 8).

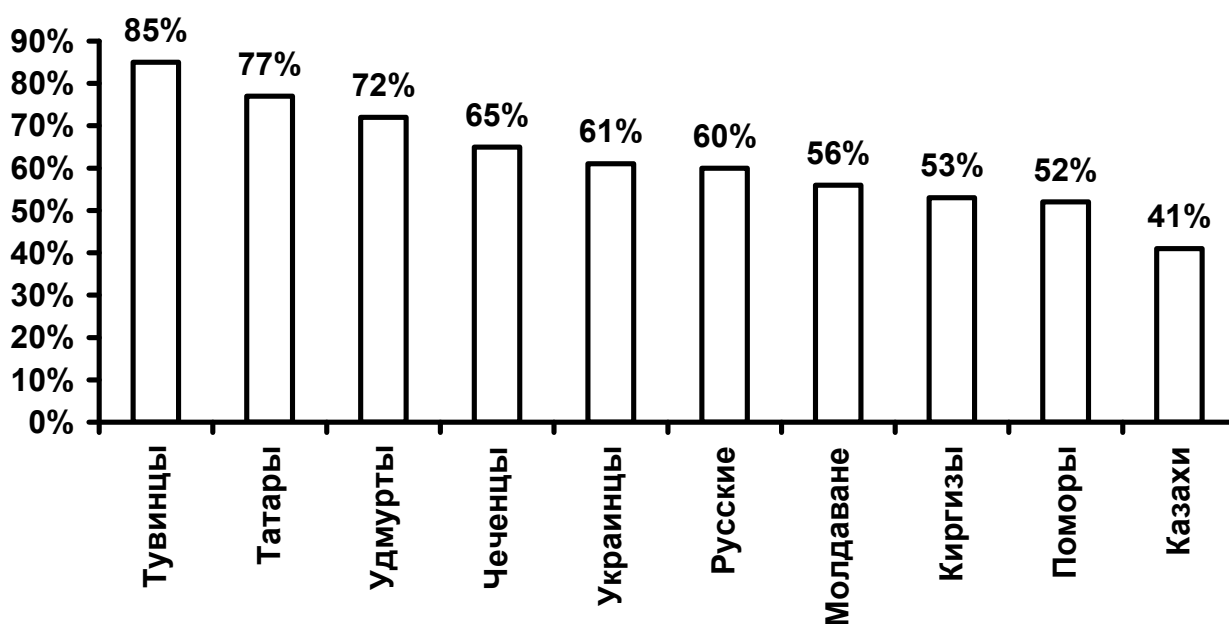


Рисунок 8. Доля генотипов, не несущих ни одного протективного генотипа

7. Связь генетического фактора и динамики основных эпидемиологических показателей в изученных популяциях.

Для проверки гипотезы о влиянии протективных полиморфизмов на динамику ВИЧ/СПИД, мы соотнесли полученные нами результаты с доступными статистическими данными по эпидемиологической обстановке в исследованных регионах. Проводили сравнение статистических данных с частотой протективных генотипов, ассоциированных с естественной устойчивостью носителя к ВИЧ/СПИД (таб. 1). Корреляции генетических

параметров популяций с динамикой основных эпидемиологических параметров на данном этапе исследования обнаружено не было (данные не приведены). Возможно, это обусловлено широким спектром факторов (помимо генетического), оказывающих существенное влияние на динамику основных эпидемиологических показателей. Тем не менее, можно рекомендовать продолжать мониторинг эпидемиологических параметров и совершенствовать методологию сбора данных, а так же пополнять информацию относительно распределения протективных аллелей в мировых популяциях с целью выявления таких зависимостей.

8. Определение относительного риска развития СПИД и смерти в результате СПИД в исследованных популяциях

На основе частот трехлокусных генотипов в изученных популяциях рассчитаны значения относительной опасности развития СПИД у ВИЧ-инфицированных (ООР) и смерти от СПИД (ООС). Данные представлены на рисунках 9 и 10.

В рассмотренных нами выборках значения ООР и ООС попадают в интервал 0.79-0.94 и 0.76-0.93, соответственно. В целом они соответствуют данным, полученным для других европейских и азиатских популяций. Широкое распространение аллеля *CCR2B-64I* в центрально-азиатской группе обусловило пониженные значения ООР и ООС. Напротив, в выборке тувинцев и популяциях Волго-Уральской группы относительный риск демонстрирует повышенные значения, что связано с низкой частотой протективных аллелей *CCR5delta32* и *CCR2B-64I*. У восточно-европейских народов и выборки чеченцев средний уровень ООР и ООС. В первом случае оказывает влияние распространенность варианта *CCR5delta32*, а во втором *CCR2B-64I*.

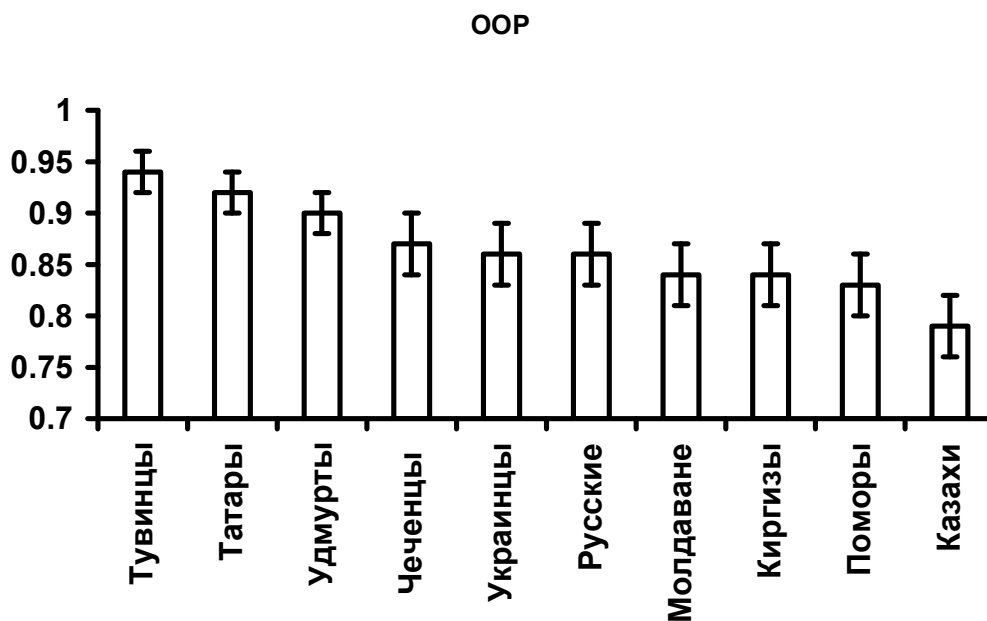


Рисунок 9. Относительная опасность развития СПИД (ООР) у ВИЧ-инфицированных в исследованных популяциях

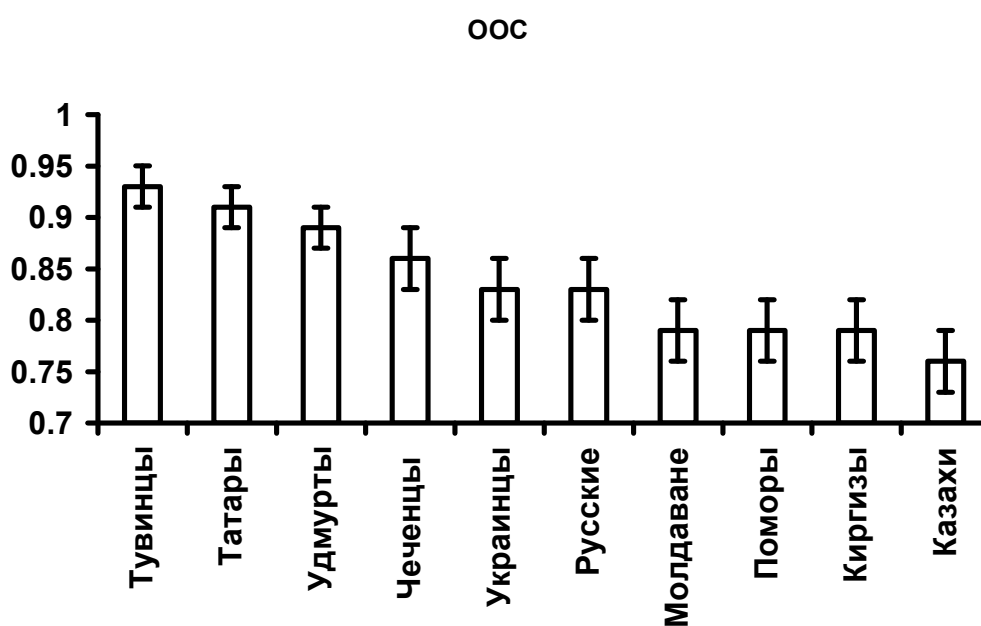


Рисунок 10. Относительная опасность смерти в результате СПИД (ООС) у ВИЧ-инфицированных в исследованных популяциях.

ВЫВОДЫ

1. Разработан лабораторный вариант тест-систем, позволяющих определять аллели *CCR5delta32*, *CCR2-64I* и *SDF1-3'A* методом ПЦР «в реальном времени». Данный подход точен и прост в применении и может быть рекомендован для использования в лабораторной практике.

2. Наиболее генетически устойчивы к заражению ВИЧ представители популяции русских поморов, ареал обитания которых близок к предполагаемому месту происхождения делеционного полиморфизма *CCR5delta32*.
3. Вследствие широкого распространения протективных аллелей, связанных с замедленной прогрессией СПИД, наиболее генетически устойчивы к развитию заболевания представители центрально-азиатских популяций.
4. Распределение частот аллеля *CCR5delta32* демонстрирует изменчивость в распространении на территории России с северо-запада на юго-восток с максимальной частотой в популяции русских поморов.
5. Распределение частот аллеля *CCR2-64I* демонстрирует изменчивость в распространении на территории России с максимальной частотой в центрально-азиатских популяциях.
6. Достоверного влияния генетического фактора на динамику основных эпидемиологических показателей обнаружено не было.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основное содержание диссертационной работы содержится в следующих публикациях:

Статьи:

1. Елов А.А., Федоров Н.А., Жибурт Е.Б., Кофиади И.В., Трофимов Д.Ю. Количественная флуоресцентно-гибридизационная ПЦР на основе отечественной аппаратуры и тест-систем// Здравоохранение и медицинская техника, 2005.- №2.- С. 10.
2. Боринская С.А., Ребриков Д.В., Нефедова В.В., Кофиади И.А., Соколова М.В., Колчина Е.В., Куликова Е.А., Чернышов В.Н., Куцев С.И., Полонников А.В., Иванов В.П., Козлов А.И., Янковский Н.К. Молекулярная диагностика и распространенность первичной гиполактазии в популяциях России и сопредельных стран.// Молекулярная биология, 2006. - Т.40. № 5. - С. 1-6.

3. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой.//Генетика, 2006. - Т.42. №1. - С. 22-32.

4. Кофиади И.А., Ребриков Д.В., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Распределение аллелей генов *CCR5*, *CCR2*, и *SDF1* ассоциированных с устойчивостью к ВИЧ-инфекции в российских популяциях// Доклады Академии Наук, 2007 - Т. 415 № 6. - С. 320-3.

6. Черноусов А.Д., Петрова Т.В., Пичугина Л.В., Литвина М.М., Донецкова А.Д., Кофиади И.А., Ребриков Д.В., Апарин П.Г. Посттерапевтическая клеточная латентность ВИЧ у пациента с исходной развернутой картиной СПИДа// Иммунология, 2007. - №6 – С. 327-331.

Материалы отечественных и международных конференций:

7. Кофиади И.А. Частоты связанных с тромбофилией аллелей генов *F5*, *F2* и *MTHFR* у представителей евразийской этнической группы, проживающих на территории России и Беларуси.//Материалы XVIII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии, 2006. – С. 14.

8. Kofiadi I., Trofimov D., Gudima G., Alexeev L. Genetic susceptibility to HIV-infection in 4 populations from Russia// 16 European Congress of Immunology, 2006. Book of abstracts, P. 129.

9. Ребриков Д.В., Кофиади И.А., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Полиморфизм генов *CCR5*, *CCR2*, и *SDF1*, ассоциированных с устойчивостью к ВИЧ-инфекции среди этнических групп проживающих на территории России и сопредельных государств.//Медицинская иммунология, 2007. - Т. 9. №2-3 - С. 309.

10. Kofiadi I.A., Trofimov D. Yu., Rebrikov D.V. Genetic susceptibility to HIV-1 infection in Russian populations.//21 European Immunogenetics and Histocompatibility Conference//The official journal of the European Federation for Immunogenetics, 2007, P. 430.