

Генотипы HLA класса в русской популяции при инсулинзависимом сахарном диабете

А.В. Зилов, *Л.П. Алексеев, *М.Н. Болдырева, И.Ю. Демидова, *Д.Ю. Трофимов,
*И.С. Гуськова, Дедов И.И.

Кафедра эндокринологии (зав.-акад. РАМН И.И. Дедов)
Московской медицинской академии им. И.М.Сеченова

*Государственный научный центр "Институт иммунологии"
(дир.-акад. РАМН Р.М. Хаитов) МЗ РФ, Москва

Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) – аутоиммунное заболевание, существенная роль в развитии которого принадлежит наследственной предрасположенности [8]. Установление генетических факторов предрасположенности к ИЗСД и патогенетически значимых маркеров заболевания имеет большое значение для выявления лиц, входящих в группу повышенного риска развития болезни (особенно в семьях с уже имеющимися больными ИЗСД), для прогноза течения ИЗСД, а также для выяснения генетически обусловленных механизмов патогенеза заболевания [6]. Решение этих задач позволит на многие годы отодвинуть, а, возможно, и предотвратить развитие заболевания, его осложнений. Последнее десятилетие ознаменовано новым качественным прорывом в изучении генетики ИЗСД, открыто большое число генов, имеющих значительную ассоциацию с заболеванием. Однако доминирующее значение по-прежнему принадлежит генам главного комплекса гистосовместимости (HLA системы).

В последнее десятилетие благодаря достижениям молекулярной биологии и генетики появилась возможность изучения не только антигенов HLA, но и кодирующих их генов. Разработанный несколько лет назад метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и применение его в ДНК-генотипировании аллелей HLA открыл перспективы в повышении эффективности изучения генетической предрасположенности к заболеваниям, что позволяет выявлять случаи более высокого относительного риска развития патологии, быстро и объективно проводить обследование значительных контингентов населения, проживающих в различных регионах России и СНГ, а также проводить обследование здоровых sibсов с целью прогноза развития ИЗСД в семьях с высокой заболеваемостью. В то же время идентификация, например, аллелей HLA II класса [5, 7] может привести к обнаружению новых, не известных до настоящего времени, но тесно ассоциированных с ИЗСД HLA-маркеров.

Изучение генов главного комплекса гистосовместимости в европеоидных и иных группах (в том числе и московской европеоидной) начали проводиться более 20 лет назад [2, 3, 4], однако переход на молекулярно-генетические методы исследований с выявлением конкретного гена (или его аллельных вариантов) позволил по-новому интерпретировать полученный ранее материал.

Цель настоящего исследования – анализ ассоциаций генетических маркеров предрасположенности и резистентности к ИЗСД, локализованных в системе HLA, с помощью ДНК-генотипирования полиморфных аллелей этой системы в русской (московской) популяционной группе.

В процессе исследования предполагалось провести HLA генотипирование специфичностей DRB1, DQA1 и DQB1 у больных ИЗСД и у здоровых доноров в качестве контроля; определить на основе результатов генотипирования частоту выявленных HLA аллелей и генотипов в исследуемых группах; изучить ассоциации с ИЗСД HLA аллелей генотипов DRB1, DQA1 и DQB1; установить высоко ассоциированные с ИЗСД аллели HLA II класса; выяснить значение сочетания HLA генотипов при этой патологии.

Обследовали 85 постоянно получающих инсулин больных. Диагноз ИЗСД поставлен или подтвержден в клинике эндокринологии ММА им. И.М.Сеченова и Эндокринологическом научном центре РАМН. Средний возраст манифестации заболевания 12 ± 10 лет, все больные находились на инсулинотерапии постоянно с момента клинической манифестации заболевания.

Контрольную группу составили 145 произвольно набранных доноров без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним. Больные ИЗСД и лица контрольной группы – жители Москвы и Московской области, относящиеся к русской популяции (европеоиды).

HLA генотипирование проводили методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции, разрабо-

танной в ГНЦ "Институт иммунологии" МЗ РФ [1], сертифицированной МЗ РФ. Проведено генотипирование по 14 аллелям DRB1, 8 аллелям DQA1 и 13 аллелям DQB1.

Частоту аллелей вычисляли по формуле: $f=n/2N$, где n – количество раз встречаемости аллеля (у гомозигот он учитывался дважды).

Относительный риск (ОР) заболеваемости вычисляли по методу Woolf по формуле $(a \times d) / (b \times c)$, где a – количество больных, имеющих данный генотип; b – количество больных, не имеющих данного генотипа; c – количество здоровых индивидуумов с данным генотипом; d – количество здоровых индивидуумов, не имеющих данного генотипа. В том случае, когда один из показателей был равен 0, относительный риск вычисляли по формуле, модифицированной Haldane для малых чисел: $[(2a+1)(2d+1)]/[(2b+1)(2c+1)]$.

Статистическую достоверность отличия ОР от 1 (p) определяли по точному двустороннему критерию Фишера для четырехполосных таблиц с поправкой на количество выявленных аллелей/генотипов (pc):

95% доверительный интервал (95% CI) вычисляли по формуле: $95\% CI = \ln OR \pm 1,96$, где OR , a , b , c , d – те же, что и в формуле для OR .

Этиологическая фракция, являющаяся мерой силы ассоциации маркера с заболеванием, вычислялась в случае $OR > 1$ по формуле $(OR - 1) \times h / OR$, где OR – относительный риск, $h = a / a + b$.

Исследование аллелей DRB1

При исследовании DRB1 аллелей было установлено, что наиболее частотными у лиц с ИЗСД были DRB1*04 (45,9%, $OR=4,59$), DRB1*17(03) (31,15%, $OR=8,06$).

В гомозиготном состоянии ОР для DRB1*04 аллеля составил 2,52, а для аллеля DRB1*17(03) – 9,58.

Аллели DRB1*01, DRB1*13 и DRB1*16 относительно часто встречались как у больных с ИЗСД, так и у лиц в контрольной группе. Относительный риск развития ИЗСД у лиц с аллелями DRB1*11 и DRB1*07 был невелик и составил 0,11 и 0,18 соответственно. Следует отметить, что считающийся протективным по развитию классического ИЗСД аллель DRB1*15 присутствовал у лиц с ИЗСД (менее 1% больных по сравнению с 12% в контрольной группе, относительный риск по наличию данного аллеля составил 0,06).

Исследование DQA1 аллелей. При исследовании DQA1 аллелей в русской популяции (контрольная группа) и в группе больных диабетом наблюдались значительные отличия в частоте аллелей DQA1*0101, DQA1*0102, DQA1*0201 DQA1*0301 и DQA1*0501. Частота других аллелей DQA1 незначительно отличалась у больных и здоровых индивидуумов или эти отличия не были достоверными.

Выявлено достоверное ($p < 0,01$) увеличение частоты аллелей DQA1*0301 и DQA1*0501 в группе боль-

ных ИЗСД. Для этих аллелей характерны и самые высокие показатели относительного риска (5,09 и 1,25 соответственно). Из низкоассоциированных с ИЗСД аллелей следует отметить DQA1*0102, DQA1*0103 и DQA1*0201 с относительным риском 0,27, 0,49 и 0,21 соответственно.

Исследование DQB1 аллелей. При исследовании распределения DQB1 аллелей наиболее частотными аллелями у больных ИЗСД оказались DQB1*0201, (35%) и DQB1*0302, (43%). Среди вычисленных показателей относительного риска максимальное значение отмечено для аллеля DQB1*0302 ($OR=7,85$; $pc=1,8 \times 10^{-4}$). Такое повышение ОР однозначно свидетельствует о положительной ассоциации этого аллеля с ИЗСД. При этом указанный аллель может рассматриваться как маркер предрасположенности к диабету. Другой аллель DQB1*0201 имеет $OR=1,79$. В гомозиготном состоянии аллель DQB1*0302 имеет $OR=4,88$, а для аллеля DQB1*0201 полученный риск не соответствовал критериям достоверности.

Минимальными и достоверными среди значений относительного риска оказалась $OR=0,13$ и 0,35 ($pc < 0,02$) для аллелей DQB1*0301 DQB1*0602-8 соответственно. Необходимо отметить, что среди больных выявлены лица, в генотипе которых содержались аллели DQB1*0602-8, что указывает лишь на низкую ассоциацию данных аллелей с ИЗСД, а не полностью протективное их значение в генотипе, как это представлялось ранее. Для аллеля DQB1*0602-8 ОР у гомозигот составил 0,13 (или $1/OR=7,98$).

Исследование генотипов DQA1 – DQB1. Исследование генотипов DQA1 – DQB1 (рис. 1, 2) показало, что наиболее высокая достоверная ассоциация характерна для генотипа DQA1*0301-DQB1*0302, относительный риск составил 10,78 и DQA1*0501-DQB1*0201 с $OR=5,89$.

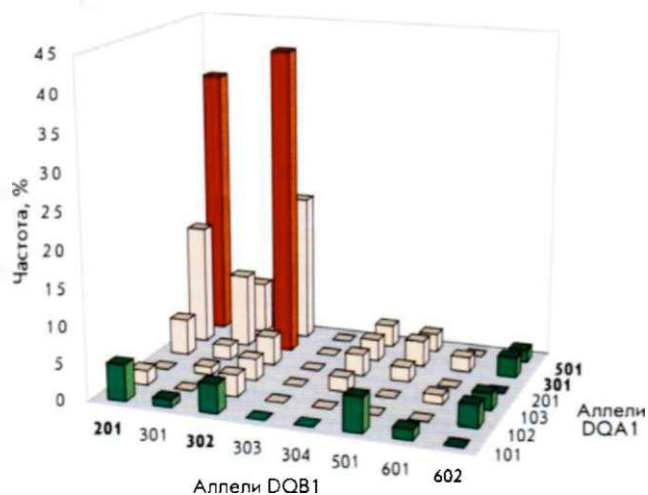


Рис. 1. Генотипы DQA1-DQB1 у больных с ИЗСД.

Выводы

1. Проведенное генотипирование аллелей HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 у больных ИЗСД и у здоровых доноров в русской популяции обнаружило маркеры предрасположенности и резистентности к ИЗСД.

2. Сравнение частот выявленных аллелей в норме и при патологии показало наличие выраженной положительной ассоциации ИЗСД с аллелями DRB1*04, DRB1*17(03), DQA1*0301 и DQB1*0302.

3. Отрицательная ассоциация с заболеваемостью ИЗСД характерна для аллелей DRB1*07, DRB1*15, DQA1*0103 и DQB1*0602-8 и DQB1*0301.

4. Генотипы DQA1*0301-DQA1*0501 и DQB1*0201-DQB1*0302 являются маркерами предрасположенности к ИЗСД в обследованной группе больных европеоидной (русской) популяции.

5. Предрасположенность к ИЗСД определяется одновременным наличием в генотипе DQA1-DQB1 аллелей, входящих в состав маркерных генотипов ИЗСД, а именно следующими их комбинациями: DQA1*0301-DQB1*0302, DQA1*0501-DQB1*0201.

Литература

1. Трофимов Д.Ю. // Автореф. к.б.н. - М. - 1996. - С. 5 - 6.
2. Awata T., Kuzuya T., Matsuda A. et al. // Diabetologia. - 1992. Vol. 35. - P. 419 - 424.
3. Bertimas J., Baur M. // In: Histocompatibility Testing. - 1984. - Heidelberg, Springer Verlag. - P. 348.
4. Bodmer J., Kennedy L., Lindsay J., et al. // Br. Med. Bull. - 1987. - Vol. 43. - P. 94 - 121.
5. Bodmer J., Marsh S., Albert E. et al. // Immunobiol. - 1993. - Vol. 187. - P. 51-69.
6. Grundbacher F. // J. Med. Genet. - 1993. - Vol. 30. - P. 533 - 535.
7. Mathews J. // In: Detection of immuno-associated genetic markers of human disease Simons M., Tait B. (Eds). London, Churchill Livingstone. - 1984. - P. 106 - 136.
8. Semana G. // Ann. Endocrinol. - 1992. - Vol 53. - P. 73 - 77.

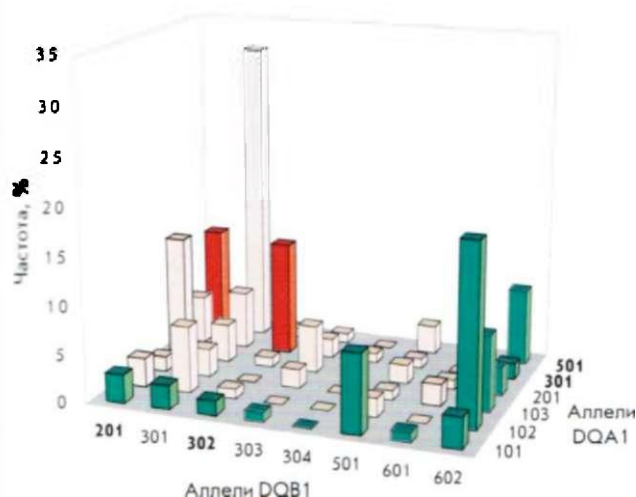


Рис. 2. Генотипы DQA1-DQB1 в контрольной группе.

Наибольшая негативная ассоциация отмечалась также с генотипом DQA1*0201-DQB1*0201 – 0,037. Достоверные негативные ассоциации отмечались с генотипами, содержащими DQA1*0102, DQA1*0103 и DQB1*0602-8.

Наиболее интересные сочетания между аллелями DRB1, DQA1 и DQB1 приведены в таблице.

Генотипы DQA1-DQB1, DRB1-DQA1 и DRB1-DQB1 у лиц с ИЗСД в русской популяции

Аллельное сочетание	Относительный риск	Различия достоверности, р
DRB1*04-DQA1*0301	11,81	5,16-14
DRB1*04-DQB1*0302	14,01	6,54-15
DQA1*0301-DQB1*0302	10,78	1,55-12
DRB1*17(03)-DQA1*0501	5,14	1,3-06
DRB1*17(03)-DQB1*0201	5,14	1,3-06
DQA1*0501-DQB1*0201	5,88	4,3-09
DRB1*15-DQA1*0102	0,03	9,4-06
DRB1*15-DQA1*0101	0,14	7,3-03
DRB1*15-DQB1*0602-8	0,02	3,9-06
DRB1*07-DQA1*0201	0,16	5,83-04
DRB1*07-DQB1*0201	0,03	5,3-05
DQA1*0201-DQB1*0201	0,03	5,3-06