

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов HLA II класса у пациентов с сахарным диабетом 1 типа в отсутствие и в сочетании с аутоиммунным тиреоидитом

Репина Е.А., Атаманова Т.М., Зверева Я.С., Тишина Ю.В., Прокофьев С.А.

ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
(директор — академик РАН и РАМН И.И. Дедов)

Цель. Провести сравнительный анализ частот аллелей и генотипов HLA II класса у пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1) по сравнению с пациентами, имеющими сочетание СД1 с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ).

Материалы и методы. Исследование генов HLA II класса было проведено 92 пациентам с СД1. Все пациенты были разделены на 2 группы: в 1-ю группу вошли 54 пациента с СД1 и АИТ и/или пациенты с СД1, у которых имелись повышенные титры антител к ткани щитовидной железы (АтЩЖ), во вторую группу вошли 38 пациентов с СД1 и отрицательными титрами АтЩЖ. HLA-генотипирование проводили методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции по трем генам: DRB1, DQA1, DQB1.

Результаты. Установлена тенденция к более частой встречаемости аллелей DRB1*01, *03(017), *04, *07, *11 и генотипов 01/03, 01/04, 03/04 у пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Имеется тенденция к увеличению частоты встречаемости вариантов комбинаций маркер/маркер и маркер/немаркер в группе пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Имеется также тенденция к увеличению частоты встречаемости варианта комбинаций немаркер/немаркер в группе с изолированным СД1. Для группы с сочетанием СД1 и АИТ отмечена тенденция к увеличению частоты встречаемости варианта комбинаций маркер/маркер по сравнению с вариантом маркер/немаркер.

Заключение. Полиморфные гены HLA II класса являются универсальной биологической системой распознавания чужеродной генетической информации. Особенности аллелей и генотипов этих генов определяют степень предрасположенности к тому или иному аутоиммунному заболеванию. Отсутствие достоверной разницы между аллелями и генотипами HLA II класса в двух исследуемых группах позволяет предположить, что основные предрасполагающие аллели и генотипы HLA II класса являются общими как для СД1, так и для АИТ. Вероятно, топик аутоиммунного воспаления определяют другие гены, участвующие в аутоиммунном процессе.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа; аутоиммунный тиреоидит; гены HLA II класса, аллели; генотипы

Comparative analysis of HLA II allele and genotype frequency distribution in patients with type 1 diabetes mellitus and autoimmune thyroiditis

Repina E.A., Atamanova T.M., Zvereva Ya.S., Tishina Yu.V., Prokof'ev S.A.
Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

Aim. To compare HLA II allele and genotype frequency distribution in type 1 diabetes mellitus (T1DM) and autoimmune thyroiditis (AIT) with that in isolated T1DM.

Materials and Methods. A total of 92 T1DM patients were subdivided into two groups. The first group comprised 54 patients with established AIT comorbidity or elevation of anti-thyroid autoantibodies (ATA). Patients with isolated T1DM (ATA-negative) formed the second group. HLA-genotyping was performed by multiprimer PCR set for the three following genes: DRB1, DQA1 and DQB1.

Results. Prevalence of alleles DRB1*01, *03(017), *04, *07, *11 and genotypes 01/03, 01/04, 03/04 tends to be higher among patients with AIT comorbidity. The comorbidity group was also characterized by the trend towards higher prevalence of "marker/marker" and "marker/non-marker" combinations favouring the former variant. Conversely, ATA-negative patients exhibited trend for higher prevalence of "non-marker/non-marker" combination.

Conclusion. Statistically insignificant difference between HLA II alleles and genotypes in the two studied groups suggests that primary genetic factors are common in these two diseases. Plausibly, genes other than DRB1, DQA1 and DQB1 determine the localization of the autoimmune process.

Keywords: type 1 diabetes mellitus; autoimmune thyroiditis; HLA II; allele; genotype

DOI: 10.14341/DM2013423-27

Сахарный диабет 1 типа (СД1) — полигенное мультифакториальное заболевание, в основе которого лежит развитие абсолютного дефицита инсулина вследствие аутоиммунной деструкции β -клеток поджелудочной железы.

Развитие СД1 на 80% зависит от генетической предрасположенности, которая связана с наследованием определенных аллелей полиморфных генов [1, 2]. Эти гены взаимодействуют друг с другом, а также с другими генами, эпигенетическими и экологическими факторами.

Наибольший вклад в предрасположенность к СД1 принадлежит локусу IDDM1, на котором находятся гены главного комплекса гистосовместимости (HLA) II класса. Расположенный на коротком плече 6 хромосомы (6p21) локус HLA II класса у людей, по оценкам ученых, вносит примерно 40–50% от общего вклада в наследственный риск развития СД1 [2].

К настоящему времени стало очевидно, что генетическая предрасположенность делится между несколькими аутоиммунными заболеваниями (АИЗ) [3–5]. Из всех вариантов сочетаний АИЗ наиболее четко это прослеживается для СД1 и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) [6–10]. Распространенность АИЗ ЩЖ у родственников больных СД1 достигает 48% по сравнению с общей популяцией — лишь 3–10% [6, 11–13]. Кроме того, СД1 и АИЗ ЩЖ часто встречаются у одного и того же человека [8, 14]. До 50% больных СД1 имели положительные антитела к ткани щитовидной железы (АтЩЖ) [9], из них примерно у 50% отмечались клинические проявления АИЗ ЩЖ [15]. С другой стороны, 2,3% детей с АИЗ ЩЖ имели антитела к островковым клеткам поджелудочной железы (ICA) по сравнению с 0% в контроле [16].

Несмотря на тесную генетическую связь между СД1 и АИЗ ЩЖ, до недавнего времени было мало известно об общих генах предрасположенности к данным заболеваниям. Многочисленные исследования показали сильное влияние генов HLA II класса на совместную предрасположенность к СД1 и АИЗ ЩЖ в семьях и у одного и того же человека [17–23].

Целью настоящего исследования является сравнительный анализ частот аллелей, гаплотипов и генотипов HLA II класса у пациентов с СД1 по сравнению с пациентами, имеющими сочетание СД1 с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ).

Материалы и методы

Исследование генов HLA II класса было проведено 92 пациентам с СД1. Всеми пациентами подписано информированное согласие на участие в исследовании.

Все пациенты были разделены на 2 группы: в 1-ю группу вошли 54 пациента с СД1 и АИТ и/или пациенты с СД1, у которых имелись повышенные титры антител к ткани щитовидной железы (АтЩЖ); 2-ю группу составили 38 пациентов с СД1 и отрицательными титрами АтЩЖ.

HLA-генотипирование проводили методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции по трем генам: *DRB1*, *DQA1*, *DQB1* [24].

Частоты аллелей определяли методом простого счета. При статистической обработке данных по частотам аллелей и генотипов использовали таблицу сопряженности и критерий хи-квадрат (χ^2), для множественных сравнений вводили поправку Бонферрони. Значимыми считали отличия, для которых $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Исследование аллелей *DRB1*

При сравнительном анализе распространенности *DRB1* аллелей у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИТ установлена тенденция к более частой встречаемости аллелей *DRB1**01, *03(017), *04, *07, *11 у пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1, однако достоверных различий между группами получено не было (табл. 1).

Исследование генотипов *DRB1/DRB1*

Как следует из табл. 2, генотипы 01/07 и 03/011 встречаются только у пациентов с сочетанием СД1 и АИТ (у 3 пациентов), в то время как генотипы 04/016 и 09/013

Таблица 1

Сравнительный анализ распределения частот аллелей *DRB1* HLA II класса у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИТ

Аллель <i>DRB1</i>	Частота аллелей гена <i>DRB1</i> HLA II класса		Значение χ^2	Уровень значимости p
	СД1+АИТ и/или серопозитивные по АтЩЖ (n=54)	СД1+серонегативные по АтЩЖ (n=38)		
01	0,13 (15)	0,14 (11)	1,44	0,16
03 (017)	0,25 (28)	0,22 (17)	1,08	0,12
04	0,36 (39)	0,35 (27)	1,08	0,12
07	0,07 (8)	0,05 (4)	0,96	0,1
08	0,02 (3)	0,01 (1)		—*
09	0,02 (3)	0,02 (2)		—*
010	0	0,01 (1)		—*
011	0,06 (7)	0,01 (1)	0,72	0,08
013	0,03 (4)	0,1 (8)		—*
016	0	0,03 (3)		—*

—* — уровень значимости p больше 0,05.

Таблица 2

Сравнительный анализ распределения частот генотипов *DRB1* HLA II класса у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИТ

Генотип <i>DRB1/DRB1</i>	Частота аллелей гена <i>DRB1</i> HLA II класса		Значение χ^2	Уровень значимости p
	СД1+АИТ и/или серопозитивные по АтЩЖ ($n=54$)	СД1+серонегативные по АтЩЖ ($n=38$)		
1/1	0,01 (1)	0,03 (1)		—*
1/3	0,09 (5)	0,05 (2)	5,72	0,26
1/4	0,09 (5)	0,18 (7)	2,42	0,11
1/7	0,05 (3)	0		—*
3/3	0,05 (3)	0,08 (3)		—*
3/4	0,22 (12)	0,18 (7)	4,18	0,19
3/7	0,01 (1)	0		—*
3/10	0	0,03 (1)		—*
3/11	0,05 (3)	0		—*
3/13	0,01 (1)	0,03 (1)		—*
4/4	0,07 (4)	0,05 (2)		—*
4/7	0,07 (4)	0,08 (3)		—*
4/8	0,05 (3)	0,03 (1)		—*
4/9	0,03 (2)	0		—*
4/11	0,03 (2)	0,03 (1)		—*
4/13	0,05 (3)	0,05 (2)		—*
4/16	0	0,05 (2)		—*
7/13	0	0,03 (1)		—*
9/11	0,01 (1)	0		—*
9/13	0	0,05 (2)		—*
11/12	0,01 (1)	0		—*
13/13	0	0,03 (1)		—*
15/16	0	0,03 (1)		—*

—* — уровень значимости p больше 0,05.

были определены только в группе пациентов с изолированным СД1 и серонегативных по АтЩЖ (у 2 пациентов). Установлена тенденция к увеличению частоты встречаемости генотипов 01/03, 01/04, 03/04 у пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Вместе с тем, достоверных различий между группами получено не было.

Нами был проведен сравнительный анализ частот генотипов гена *DRB1* HLA II класса у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИТ с учетом известных предрасполагающих/защитных вариантов гена *DRB1* HLA II класса (табл. 3). Все типированные образцы от больных СД1 в зависимости от HLA-генотипа были разделены на три группы: маркер/маркер, если в генотипе присутствовали любые два варианта гена *DRB1* из группы *DRB1**01, *03, *04, *08, *09, *10; немаркер/немаркер, если в генотипе присутствовали любые два варианта

гена *DRB1* из группы *DRB1**07, *11, *12, *13, *14, *15, *16; маркер/немаркер, если в генотипе один вариант был из группы *DRB1**01, *03, *04, *08, *09, *10, а другой — из группы *DRB1**07, *11, *12, *13, *14, *15, *16 [25].

Как видно из представленной таблицы, прослеживается тенденция к увеличению частоты встречаемости вариантов комбинаций маркер/маркер и маркер/немаркер в группе пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Имеется также тенденция к увеличению частоты встречаемости варианта комбинаций немаркер/немаркер в группе с изолированным СД1. Для группы с сочетанием СД1 и АИТ имеется тенденция к увеличению частоты встречаемости варианта комбинаций маркер/маркер по сравнению с вариантом маркер/немаркер (χ^2 с поправкой Бонферрони — 0,21–0,42*). Однако достоверной разницы между группами получено не было.

Таблица 3

Сравнительный анализ распределения частот генотипов *DRB1-DRB1* HLA II класса у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИТ с учетом известных предрасполагающих/защитных вариантов

Варианты комбинаций гена <i>DRB1</i> HLA II класса	Частота аллелей гена <i>DRB1</i> HLA II класса		Значение χ^2	Уровень значимости p
	СД1+АИТ и/или серопозитивные по АтЩЖ ($n=54$)	СД1+серонегативные по АтЩЖ ($n=38$)		
Маркер/маркер	0,64 (35)	0,63 (24)	0,34	0,17
Маркер/немаркер	0,33 (18)	0,28 (11)	0,32	0,16
Немаркер/немаркер	0,01 (1)	0,07 (3)	0,34	0,17

—* — уровень значимости p больше 0,05.

Выводы

Полиморфные гены HLA II класса являются универсальной биологической системой распознавания чужеродной генетической информации.

Особенности аллелей и генотипов этих генов определяют степень предрасположенности к тому или иному аутоиммунному заболеванию.

Отсутствие достоверной разницы между аллелями и генотипами HLA II класса в двух исследуемых группах позволяет предположить, что основные предрасполагающие аллели и генотипы HLA II класса являются общими как для СД1, так и для АИТ. Вероятно, топик аутоиммунного воспаления определяют другие гены, участвующие в аутоиммунном процессе.

Установлена тенденция к более частой встречаемости аллелей *DRB1**01, *03(017), *04, *07, *11 и ге-

нотипов 01/03, 01/04, 03/04 у пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1.

Имеется тенденция к увеличению частоты встречаемости вариантов комбинаций маркер/маркер и маркер/немаркер в группе пациентов с сочетанием СД1 и АИТ по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Имеется также тенденция к увеличению частоты встречаемости варианта комбинаций немаркер/немаркер в группе с изолированным СД1. Для группы с сочетанием СД1 и АИТ отмечена тенденция к увеличению частоты встречаемости варианта комбинаций маркер/маркер по сравнению с вариантом маркер/немаркер.

Данные тенденции должны быть учтены при анализе большей выборки пациентов исследуемых групп.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с рукописью.

Список литературы

1. Алексеев ЛП, Дедов ИИ, Хаитов РМ, Болдырева МН, Шестакова МВ, Петеркова ВА, и др. Клиническая значимость определения HLA-DRB1-генотипов, ассоциированных с предрасположенностью или устойчивостью к сахарному диабету 1 типа в различных этнических группах России. Сахарный диабет. 2007;(2):2–5. [Alekseev L, Dedov I, Khaïtov R, Boldyreva M, Shestakova M, Peterkova V, et al. Klinicheskaya znachimost' opredeleniya HLA-DRB1-genotipov, assotsiirovannykh predraspolozhennost'yu ili ustoychivost'yuk sakharному diabētu 1 tipa, v razlichnykh etnicheskikh gruppakh Rossii. Diabetes mellitus. 2007;(2):2–5. doi: 10.14341/2072-0351-5787].
2. Дедов ИИ, Шестакова МВ. Сахарный диабет. Руководство для врачей. Москва: Универсум Паблишинг. 2003. С. 77–81. [Dedov II, Shestakova MV. Diabetes mellitus. Guidelines for Physicians. Moscow: Universum Publishing; 2003.]
3. Becker KG, Simon RM, Bailey-Wilson JE, Freidlin B, Bid-dison WE, McFarland HF, et al. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95(17):9979–9984. DOI: 10.1073/pnas.95.17.9979
4. Encinas JA, Kuchroo VK. Mapping and identification of autoimmunity genes. Curr Opin Immunol 2000;12(6):691–697. DOI: 10.1016/S0952-7915(00)
5. Bias WB, Reveille JD, Beaty TH, Meyers DA, Arnett FC. Evidence that autoimmunity in man is a Mendelian dominant trait. The American Journal of Human Genetics. 1986;39(5):584–602.
6. McCanlies E, O'Leary LA, Foley TP, Kramer MK, Burke JP, Libman A, et al. Hashimoto's thyroiditis and insulin-dependent diabetes mellitus: differences among individuals with and without abnormal thyroid function. J Clin. Endocrinol Metab. 1998;1998(5):1548–1551. DOI: 10.1210/jc.83.5.1548
7. Dittmar M, Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes: immunogenetics and long-term follow-up. J Clin Endocrinol Metab 2003;88(7):2983–2992. DOI: 10.1210/jc.2002-021845
8. Levin L, Tomer Y. The etiology of autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common genetic susceptibility Autoimmunity Reviews. 2003;2(6):377–386. DOI: 10.1016/S1568-9972(03)00080-6
9. Huber A, Menconi F, Corathers S, Jacobson EM, Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. Endocrine Review. 2008;29(6):697–725. DOI: 10.1210/er.2008-0015
10. Репина ЕА. Общие генетические маркеры сахарного диабета 1 типа и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы. Сахарный диабет. 2011;(2):23–30. [Repina E. The role of common genetic markers in susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroid diseases. Diabetes mellitus. 2011;(2):23–31. DOI: 10.14341/2072-0351-5630]
11. Burek CL, Rose NR, Guire KE, Hoffman WH. Thyroid autoantibodies in black and in white children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and their first degree relatives Autoimmunity. 1990;7(2–3):157–167.
12. Jaeger C, Hatziaelaki E, Petzoldt R, Bretzel RG. Comparative Analysis of Organ-Specific Autoantibodies and Celiac Disease – Associated Antibodies in Type 1 Diabetic Patients, Their First-Degree Relatives, and Healthy Control Subjects. Diabetes Care. 2001;24(1):27–32. DOI: 10.2337/diacare.24.1.27
13. Sougioultzoglou F, Falorni A, Kassi G, Brozzetti A, Karamitsos D, Koliakos GG. Coincidence of high antiislet and antithyroid autoantibody titres in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 2005; 113(2):85–89. DOI: 10.1055/s-2005-837510.
14. Kordonouri O, Deiss D, Danne T, Dorow A, Bassir C, Grütters-Kieslich A. Predictivity of thyroid autoantibodies for the development of thyroid disorders in children and adolescents with Type 1 diabetes. Diabet Med. 2002;19(6):518–521. DOI: 10.1046/j.1464-5491.2002.00699.x
15. Bright GM, Blizzard RM, Kaiser DL, Clarke WL. Organ-specific autoantibodies in children with common endocrine diseases. The Journal of Pediatrics. 1982;100(1):8–14.
16. Eisenbarth GS, Gottlieb PA. Autoimmune Polyendocrine Syndromes. New England Jour-

- nal of Medicine. 2004;350(20):2068–2079. DOI: 10.1056/NEJMra030158
17. Wallaschofski H, Meyer A, Tuschy U, Lohmann T. HLA-DQA1*0301-associated susceptibility for autoimmune polyglandular syndrome type II and III. *Hormone and Metabolic Research*. 2003;35(2):120–124. DOI: 10.1055/s-2003-39059.
 18. Santamaria P, Barbosa JJ, Lindstrom AL, Lemke TA, Goetz FC, Rich SS. HLA-DQB1-associated susceptibility that distinguishes Hashimoto's thyroiditis from Graves' disease in type I diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994;78(4):878–883. DOI: 10.1210/jc.78.4.878
 19. Santamaria P, Barbosa JJ, Lindstrom AL, Lemke TA, Goetz FC, Rich SS. HLA-DQB1-associated susceptibility that distinguishes Hashimoto's thyroiditis from Graves' disease in type I diabetic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1994;78(4):878–883. DOI: 10.1210/jc.78.4.878.
 20. Levin L, Ban Y, Concepcion E, Davies TF, Greenberg DA, Tomer Y. Analysis of HLA genes in families with autoimmune diabetes and thyroiditis. *Human Immunology*. 2004;65(6):640–647. DOI: 10.1016/j.humimm.2004.02.026
 21. Golden B, Levin L, Ban Y, Concepcion E, Greenberg DA, Tomer Y. Genetic Analysis of Families with Autoimmune Diabetes and Thyroiditis: Evidence for Common and Unique Genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(8):4904–4911. DOI: 10.1210/jc.2004-2236
 22. Huang W, Connor E, Rosa TD, Muir A, Schatz D, Silverstein J, et al. Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81(7):2559–2563. DOI: 10.1210/jc.81.7.2559
 23. Holl RW, Bohm B, Loos U, Grabert M, Heinze E, Homoki J. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. Effect of age, gender and HLA type. *Hormone Research*. 1999;52(3):113–118. DOI: 10.1159/000023446
 24. Никонова ТВ, Дедов ИИ, Алексеев ЛП, Болдырева МН, Смирнова ОМ, Дубинкин ИВ. Сахарный диабет. 2000;(2):2–5. DOI: [Nikonova T, Dedov I, Alekseev L, Boldyreva M, Smirnova O, Dubinkin I. Prognostirovanie SD 1 tipa v gruppakh vysokogo riska. *Diabetes mellitus*. 2000;(2):2–6. DOI: 10.14341/2072-0351-5877]
 25. Болдырева МН, Хаитов РМ, Дедов ИИ, Богатова ОВ, Гуськова ИА, Янкевич ТЭ, и др. Новый взгляд на механизм HLA ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1 типа. Теоретические и прикладные аспекты. *Иммунология*. 2005;26(6):324–329. [Boldyreva MN, Khaitov RM, Dedov II, Bogatova OV, Gus'kova IA, Yankevich TE, et al. New opinion at the mechanism of HLA-associated predisposition to 1 type diabetes: theoretical and applied aspects. *Immunology*. 2005;26(6):324–329].

Репина Екатерина Александровна	к.м.н., с.н.с. лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва E-mail: e_repina@mail.ru
Атаманова Татьяна Михайловна	к.м.н., с.н.с. лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
Зверева Яна Станиславовна	к.м.н., с.н.с. сотрудник лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
Тишина Юлия Владимировна	н.с. лаборатории генетики и клинической иммунологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва
Прокофьев Сергей Александрович	к.м.н., зав. лабораторией генетики и клинической иммунологии, ФГБУ Эндокринологический научный центр, Москва