

Установление «функционального» HLA-DRB1-генотипа - способ прогнозирования риска развития СД1

Болдырева М.Н., д.м.н., Прокофьев С.А., к.м.н., Алексеев Л.Л., д.м.н., профессор, Дедов И.И., академик, ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Эндокринологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, г. Москва

«Functional» HLA-DRB1 genotyping - the way of the prediction of risk of dm1 development

Boldyreva M. N., Prokofyev S.A., Alexeev L.P., Dedov I.I.

Резюме

Описан новый способ прогнозирования высокого и низкого риска развития СД1, который позволяет оценивать генетический риск развития СД1 вне зависимости от этнической принадлежности обследуемого на основе установления «функционального» HLA-DRB1-генотипа, состоящего из 2 вариантов гена DRB1, ассоциированных с развитием СД1. Метод может служить дополнительным лабораторным симптомом СД1 для дифференциальной диагностики аутоиммунного сахарного диабета, а также может быть использован для прогнозирования развития СД1 у родственников больных СД1 с целью выявления лиц с высокой и низкой генетической предрасположенностью к развитию СД1.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, аутоиммунитет, HLA-DRB1, прогнозирование

Summary

The new way of prediction of high and low risk of development DM1 which allows to estimate genetic risk of development DM1 without dependence from an ethnic origin by the use of "functional" HLA-DRB1-genotype, that consist of 2 variants of DRB1-gene, associated with development DM1. This method can serve as additional laboratory sign for autoimmune's diabetes diagnosis establishment and also can be used for prediction of development DM1 among relatives of patients DM1 for the purpose of revealing of persons with high and low genetic predisposition to development DM1.

Key words: diabetes mellitus 1, autoimmunity, HLA-DRB1, prediction

Введение

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – многофакторное заболевание с выраженным генетическим компонентом, возникающее в результате аутоиммунного разрушения β-клеток поджелудочной железы, является одним из наиболее широко распространенных и тяжелых заболеваний человека.

В настоящее время в мире этим заболеванием страдает более 30 млн. человек, преимущественно молодого, трудоспособного возраста, поэтому решение вопросов, связанных с диагностикой и прогнозированием развития заболевания, имеет важное социальное и медицинское значение.

В соответствии с современными представлениями предрасположенность к СД1 в очень большой степени генетически детерминирована и контролируется целым рядом генов. На сегодняшний день общепризнано, что 50-70% генетического риска развития СД1 обеспечивают гены HLA класса II, расположенные на коротком пле-

че 6-хромосомы (6р21), являясь таким образом, главным генетическим локусом, определяющим предрасположенность к развитию СД1.

Все другие, не-HLA-гены, которых на сегодняшний день установлено уже более 40, имеют существенно меньшую, чем гены HLA класса II, связь с развитием СД1. Наиболее значимыми из них являются ген инсулина, а также гены, участвующие в контроле иммунного ответа, такие как, например PTPN22, CTLA4, IL2RA, IFIH1 и т.д.

В последнее десятилетие типирование генов HLA класса II с целью обнаружения классических «маркеров» СД1 – DRB1*03, DRB1*04, а также их гаплотипов DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 и DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 в качестве дополнительных лабораторных симптомов СД1 стало широко применяться в клинической практике врачей-эндокринологов. В самое последнее время были получены данные о значительном более существенном значении для генетического контроля развития СД1 полного состава DRB1-генотипа (сочетания двух вариантов гена DRB1), по сравнению с обнаружением тех или иных конкретных вариантов DRB1-генов, ассоциированных с СД1, что открывает дополнительные возможности прогнозирования развития СД1.

Ответственный за ведение переписки -
Болдырева Маргарита Николаевна,
тел.: (495) 980 45 55
e-mail: m.n.boldyreva@mail.ru

Материалы и методы

Были обследованы больные с верифицированным диагнозом сахарного диабета I типа, проходившие обследование и лечение в Эндокринологическом научном центре МЗ РФ (n=456). Контрольную группу составили случайным образом отобранные, здоровые на момент исследования доноры крови (n=1547).

Геномную ДНК выделяли из периферической крови методом высаливания по стандартной процедуре. HLA типирование гена DRB1 проводили методом мультипраймерной амплификации сиквенс-специфическими праймерами на основе ПЦР на уровне групп аллелей (соответствующих серологическим специфичностям). Для типирования гена HLA класса II (DRB1) использовали наборы HLA-ДНК-Тех (фирма «НПФ ДНК-Технология», Россия). Реакцию амплификации проводили на амплификаторе «Терцик» («НПФ ДНК-Технология») по программам, рекомендованным производителями набора. Детекцию продуктов амплификации проводили при помощи электрофореза в 3% агарозном геле. HLA-типирование на уровне групп аллелей предусматривает выявление следующих вариантов гена DRB1: DRB1*01, *15(02), *16(02), *03, *04, *11(05), *12(05), *13(06), *14(06), *07, *08, *09 и *10.

Относительный риск (ОР) вычисляли по формуле В. Woolf. Статистическую достоверность определяли по точному двустороннему критерию Фишера без корректировки на количество аллелей.

Результаты и обсуждение

По результатам собственных исследований 11 различных популяционных групп [1,2] ранее нами был сформулирован новый подход к определению генетической предрасположенности к СД1, который сопровождался введением нового понятия – «функциональный» DRB1-генотип [1,2]. В соответствии с ним «функционально» гомозиготный генотип может состоять из 2 разных вариантов DRB1-гена, но которые, функционально проявляют себя сходным образом, например оба контролируют генетическую предрасположенность к аутоиммунному сахарному диабету. Таким образом, «функционально» гомозиготные генотипы содержат по 2 варианта генов (одинаковые или разные), предопределяющие сходные функции.

Все варианты гена DRB1 были разделены на две группы - ассоциированные с чувствительностью и ассоциированные устойчивостью к развитию аутоиммунного сахарного диабета. Таким образом, все варианты гена DRB1 образуют три возможных варианта «функциональных» генотипов:

1) «функционально» гомозиготный по аутоиммунному типу – генотип, состоящий из двух любых вариантов гена DRB1, ассоциированных с развитием СД1 из числа DRB1*01, *03, *04, *08, *09 и *10.

2) «функционально» гомозиготный по неаутоиммунному типу - генотип, состоящий из двух любых вариантов гена DRB1, не ассоциированных с развитием СД1 из числа DRB1*15(02), *16(02), *11(05), *12(05), *13(06), *14(06), *07.

3) «функционально» гетерозиготный генотип, состоящий из 1 любого варианта гена DRB1, из числа ассоциированных с развитием СД1 и 1 любого варианта гена DRB1 из числа неассоциированных с развитием СД1.

Результаты ранее проведенного анализа, свидетельствовали о том, что предрасположенность к развитию СД1 предопределяется наличием в генотипе не менее двух HLA DRB1 «маркеров» СД1, что соответствует «функционально» гомозиготному аутоиммунному генотипу. Отсутствие в генотипе хотя бы одного DRB1 «маркера», и, особенно, полное их отсутствие, делает развитие СД1 чрезвычайно маловероятным событием. Эта закономерность прослеживалась у большинства исследованных популяционных групп, относящихся по расовой принадлежности как к европеоидам (русские, татары, мари, удмурты), так и к монголоидам (буряты) и евромонголоидам (узбеки). Исключение составляли лишь калмыки и тувинцы (монголоиды), для которых различия оказались недостоверными что, скорее всего, было связано с малочисленностью групп больных СД1 тувинцев и калмыков, обусловленной чрезвычайно низкой заболеваемостью СД1 представителей этих популяций.

На основании данных литературы о маркерах чувствительности и устойчивости к развитию СД1 в разных популяциях мира (таблица 1 и 2), которые свидетельствуют о том, что для разных популяций, в том числе и относящихся к разным расам, таким как европеоидная и монголоидная, HLA-DR-маркеры чувствительности и устойчивости к СД1 одни и те же, то есть не зависят от популяционной принадлежности.

На основании этих данных мы объединили все 11 исследованных популяционных групп в одну (n=548 СД1 и n=1547 контроль) и получили данные о значимости для предрасположенности к СД1 только варианта «функционально» гомозиготного аутоиммунного генотипа (таблица 3).

Величина относительного риска (ОР) означает, во сколько раз чаще встречается заболевание при наличии в генотипе индивидуума разных вариантов «функционального» DRB1-генотипа по сравнению с частотой заболевания у индивидуума без этих вариантов «функционального» DRB1-генотипа. Значения ОР большие, чем 1, свидетельствуют о том, что конкретный вариант «функционального» DRB1-генотипа ассоциирован с развитием СД1. Значения ОР, меньшие, чем 1, свидетельствуют об ассоциации вариантов HLA генов с устойчивостью к развитию заболевания. Значение ОР около 1,0 свидетельствует об отсутствии связи между DRB1-генотипом и СД1.

Далее была дополнительно исследована группа больных СД1, предоставленная сотрудниками Эндокринологического научного центра РАМН (г.Москва). После проведения HLA-DRB1 генотипирования 456 больных СД1, были получены следующие данные ОР в зависимости от «функционального» генотипа: при наличии аутоиммунного гомозиготного «функционального» генотипа ОР составил 8,0 (p<0,000), при наличии гетерозиготного «функционального» генотипа ОР=0,59 (p<0,000), при на-

Таблица 1. DR маркеры СД1 в разных популяциях (литературный источник)

DR-специфичности	Популяции
DR1	татары, удмурты [1,2]
DR3	русские, татары, марийцы, удмурты, узбеки, тувинцы [1,2], англичане [7], датчане [14], немцы [13], словаки [15], поляки [8], испанцы [4], турки [12], евреи [9], арабы [9], чилийцы [11], венгры [6], китайцы [3], японцы [5]
DR4	русские, татары, марийцы, удмурты, узбеки, тувинцы, буряты [1,2], англичане [7], датчане [14], немцы [13], словаки [15], поляки [8], испанцы [4], турки [12], евреи [9], арабы [9], чилийцы [11], венгры [6], китайцы [3], японцы [5]
DR8	датчане [14]
DR9	калмыки [1,2], датчане [14], китайцы [3]

Таблица 2. DR маркеры положительно или нейтрально ассоциированные с устойчивостью к СД1 в разных популяция (по данным литературы)

DR-специфичности	Популяции (литературный источник)
DR2 (15,16)	русские, татары, марийцы, удмурты, узбеки [1,2], испанцы [4], турки [12], датчане [14], евреи [9], арабы [9], австралийцы [10], итальянцы [16]
DR5 (11,12)	русские, удмурты, узбеки [1,2], турки [12], итальянцы [16]
DR6 (13,14)	русские, татары, марийцы, узбеки [1,2], турки [12], испанцы [4], евреи [9], арабы [9]
DR7	русские, татары, удмурты [1,2], датчане [14]

Таблица 3. Относительный риск развития СД1 в зависимости от генотипа (n=548 СД1 и n=1547 контроль)

Варианты «функционального» генотипа	Относительный риск	P
Аутоиммунный гомозиготный	7,6	0,000...
Гетерозиготный	0,59	0,000...
Не-аутоиммунный гомозиготный	0,12	0,000...

Таблица 4. Относительный риск развития СД1 в зависимости от «функционального» генотипа (n=1004 СД1 и n=1547 контроль)

Варианты «функционального» генотипа	Относительный риск	P
Аутоиммунный гомозиготный	7,8	0,000...
Гетерозиготный	0,59	0,000...
Не-аутоиммунный гомозиготный	0,11	0,000...

личии «функционально» гомозиготного неаутоиммунно-го генотипа $OR=0,1$ ($p<0,000$)

Суммарные уточненные данные по относительному риску развития СД1 при различных вариантах «функционального» DRB1-генотипа, полученные в результате обследования 1004 больных СД1 и 1547 контрольных субъектов представлены в таблице 4.

Результаты, представленные в таблице 4, подтверждают полученные ранее данные, что HLA-генетическая предрасположенность к развитию сахарного диабета I типа связана только с генотипом, «функционально» гомозиготным по аутоиммунному типу. Все другие варианты «функционального» HLA-DRB1-генотипа гена не ассоциированы с развитием СД1, а учитывая тот факт, что HLA-DRB1-генетические маркеры СД1 являются уни-

версальными для разных популяций, при определении «функционального» HLA DRB1-генотипа с целью прогноза заболевания не требуется учитывать этническую принадлежность обследуемых лиц.

Выводы

Таким образом, проведенные собственные исследования, а также сходные данные об HLA-генетических маркерах предрасположенности к развитию сахарного диабета I типа, полученные иммуногенетиками из разных стран мира, позволяют сделать заключение об универсальности предложенного способа оценки «функционального» DRB1-генотипа для определения индивидуального и семейного генетического риска развития СД1 у пациентов, принадлежащих к различным этническим группам.

Применение генетического метода установления «функционального» DRB1-генотипа для оценки предрасположенности к СД1 без учета этнической принадлежности исследуемого пациента, делает возможным выполнение дифференциальной диагностики и прогнозирование заболевания на индивидуальном и семейном уровне. Подоб-

ная возможность позволяет более эффективно диагностировать заболевание на ранних его этапах, а также формировать группы высокого и низкого риска развития СД1 в семьях больных СД1 для последующего мониторинга субъектов с высоким генетическим риском развития СД1 и исключения из контроля субъектов с низким риском развития СД1. ■

Литература:

1. Болдырева М.Н., Хайтов Р.М., Дедов И.И. и др. Новый взгляд на механизм HLA ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1 типа. Теоретические и прикладные аспекты. Иммунология. - 2005. - №6. - С324-329
2. Boldyreva M, Trofimov D, Alexeev L, Dedov I. Significance of HLA DRB1-genotypes for prediction of Type 1 Diabetes Mellitus. Proceeding of 2nd European Congress of Immunology. 2009, p227-230.
3. Chuang L, Tsai S, Juang J, Tsai W, Tai T. Genetic epidemiology of type 1 diabetes mellitus in Taiwan. // Diabetes Res. Clin. Pract. - 2000. - Vol.50 Suppl 2. - P.41-7.
4. Escribano-de-Diego J, Sanchez-Velasco P, Luzuriaga C. et al. HLA class II immunogenetics and incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the population of Cantabria (Northern Spain). // Hum. Immunol. - 1999. - Vol. 60(10). - P. 990-1000.
5. Hamaguchi K, Kimura A., Seki N. Et al. Analysis of tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-B and -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese. // Tissue Antigens. - 2000. - Vol.55(1). - P.10-6.
6. Hermann R, Mijovic C.H., Rayner M. et al. HLA alleles and IDDM in children in Hungary: a comparison with Finland. // Hum. Immunol. - 2001. - Vol.62(4). - P.391-8.
7. Horton V., Stratton I., Bottazzo G.F. et al. Genetic heterogeneity of autoimmune diabetes: age of presentation in adults is influenced by HLA DRB1 and DQB1 genotypes (UKPDS 43) UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. // Diabetologia. - 1999. - Vol.42(5). - P.608-16.
8. Kretowski A., Kinalska I. Evaluation of selected HLA DRB1 gene alleles as genetic markers of type I diabetes in the population of northeastern Poland. // Pol. Merkuriusz Lek. - 1999. - Vol. 7(41). - P. 208-10.
9. Kwon O.J., Brautbar C., Weintrob N. et al. Immunogenetics of HLA class II in Israeli Ashkenazi Jewish, non-Ashkenazi Jewish, and Israeli Arab IDDM patients. // Hum. Immunol. - 2001. - Vol. 62(1). - P. 85-91.
10. Price P., Cheong K.Y., Boodhoo A. et al. Can MHC class II genes mediate resistance to type 1 diabetes? // Immunol. Cell Biol. - 2001. - Vol. 79(6). - P. 602-6.
11. Santos J.L., Perez-Bravo F., Carrasco E. et al. Association between HLA-DQB1 alleles and type 1 diabetes in a case-parents study conducted in Santiago, Chile. // Am. J. Epidemiol. - 2001. - Vol. 153(8). - P. 794-8.
12. Saruhan-Direskeneli G., Uyar F.A., Bas F. et al. HLA-DR and -DQ associations with insulin-dependent diabetes mellitus in a population of Turkey // Hum. Immunol. - 2000. - Vol. 61(3). - P. 296-302.
13. Schenker M., Hummel M., Ferber K. et al. Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with Type I diabetes: the German BABYDIAB study. // Diabetologia. - 1999. - Vol.42(6). - P. 671-7
14. Schipper R.F., Koeleman B.P., Bruining G.J. et al. HLA class II associations with Type 1 diabetes mellitus: a multivariate approach. // Tissue Antigens. - 2001. - Vol. 57(2). - P. 144-50.
15. Shawkatova I., Fazekasova H., Michalkova D., Martinka E. Association of type diabetes mellitus with HLA alleles. // Bratisl. Lek. Listy. - 2000. - Vol. 101(11). - P. 624-5.
16. Tiberti C., Buzzetti R., Anastasi E. et al. Autoantibody negative new onset type 1 diabetic patients lacking high risk HLA alleles in a Caucasian population: are these type 1b diabetes cases? // Diabetes Metab. Res. Rev. - 2000. - Vol. 16(1). - P. 8-14.