

Полиморфизм генов *HLA* класса II и *CTLA4* здоровых бурят и больных сахарным диабетом 1 типа в Бурятской Республике

И.И. Дедов, Л.И. Колесникова*, О.Н. Иванова, Т.П. Бардымова*,
Н.Г. Карлова*, Т.М. Атаманова, С.А. Прокофьев

ГУ Эндокринологический научный центр
(дир.- акад. РАН и РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва,

*ГУ НЦ медицинской экологии ВСНЦ
(дир.- член-корр. РАМН Л.И. Колесникова) СО РАМН, Иркутск

Сахарный диабет 1 типа (СД1) — многофакторное аутоиммунное заболевание с полигенным типом наследования. Наследственная предрасположенность к СД1 определяется комбинацией аллелей ряда predisposing генов, что в сочетании с внешними факторами может приводить к развитию заболевания.

Полный геномный поиск [1] позволил выявить 12 локусов предрасположенности к СД1 (*IDDM 1-12*), находящихся на разных хромосомах. В настоящее время количество генов, ассоциированных с СД1 типа, возросло до 20. Следует отметить, что эти локусы (кроме *IDDM2/11p15/-* ген инсулина и *IDDM17/10q25*) ассоциированы с развитием не только СД1, но и других аутоиммунных заболеваний [2]. Среди всех генетических локусов предрасположенности к СД1 ведущая роль отводится генам локуса *HLA* (human leukocyte antigen) класса II (около 40% наследуемого риска) [2, 3].

Ассоциация *HLA* аллелей с заболеванием СД1 была установлена около 30 лет назад [4]. Сравнительный анализ гомозиготных близнецов и *HLA* — гаплоидентичных сибсов выявил 40–50% конкордантность по *HLA* маркерам СД1. Известны гаплотипы *HLA* класса II, ассоциированные с высоким риском заболевания СД1 [5]: *DRB1*0401(*0402, *0405) — DQA1*0301 — DQB1*0302* и *DRB1*0301 — DQA1*0501 — DQB1*0201*.

В США 90% больных СД1 имеют хотя бы один из predisposing гаплотипов (в популяции в целом — 20%). Примерно 35% больных СД1 в США являются *DRB1*0401(*0402, *0405) — DQA1*0301 — DQB1*0302* и *DRB1*0301 — DQA1*0501 — DQB1*0201* гетерозиготами (против 2,4% в популяции в целом) [6].

С другой стороны, гаплотип *DRB1*15 — DQA1*0102 — DQB1*0602* во многих популяциях является протективным по отношению к СД1.

Различные этнические группы имеют отличия по частоте встречаемости аллелей и гаплотипов *HLA* класса II. Генетическая гетерогенность эт-

нических популяций в комплексе с факторами окружающей среды определяет особенности распространенности и клинического течения СД1. Среди тувинцев (монголоиды) больные СД1 встречаются с частотой 0,01%, т.е. в 5 раз реже, чем среди русских, проживающих в той же географической зоне [7]. Показано, что у представителей монголоидной расы заболеваемость СД1 на порядок ниже [8].

Бурятская популяция, как и многие монголоидные популяции (китайская, японская), отличается низкой распространенностью СД1 — 0,024%. Это в 10–30 раз меньше, чем в других этнических группах.

Данные о распределении predisposing и протективных аллелей генов *HLA* класса II по отношению к СД1 среди бурят опубликованы в работах [9,10].

В развитии заболеваний аутоиммунной природы важную роль играет нарушение механизма не только инициации, но и терминации иммунного отве-

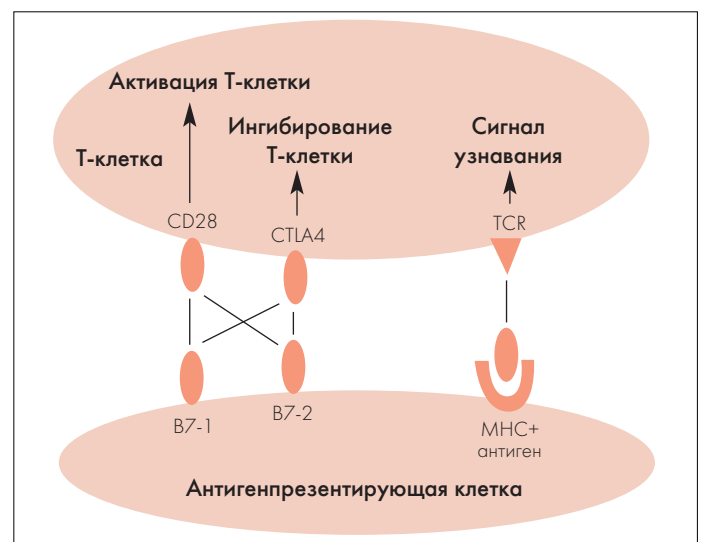


Рис. 1. Маркерные молекулы, участвующие в активации и торможении Т-клеток.

та и возможность потери толерантности к аутоантигенам. Один из способов обеспечения периферической толерантности (физиологического торможения иммунного ответа) связан с негативной регуляцией активированных Т-клеток продуктом гена *CTLA4* (*ITIM2*).

На рис. 1 представлена схема взаимодействия Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой. Антигенпрезентирующие клетки (АПК) с помощью молекул *HLA* класса II главного комплекса гистосовместимости представляют пептиды (собственные или чужеродные) Т-клеткам.

Взаимодействие комплекса белков *HLA* класса II АПК и Т-клеточного рецептора (ТКР) необходимо, но недостаточно для активации Т-клеток. Требуется дополнительный сигнал — взаимодействие костимуляторных рецепторов со своими лигандами. CD28 — основной костимулирующий рецептор [11], конститутивно экспрессирующийся на Т-клетках, связываясь с CD80/CD86 (B7-1/B7-2) АПК, активирует Т-клетки, тогда как рецептор CD152, кодируемый геном *CTLA4*, экспрессирующийся на поверхности активированных Т-клеток, связываясь с теми же лигандами (CD80/CD86), ограничивает пролиферацию активированных Т-клеток, обеспечивает их негативную регуляцию, вызывая анергию или апоптоз [12]. Нарушение баланса взаимодействия между CD80/CD86 с CD28 и CD152 может привести к потере ауто толерантности и развитию аутоиммунных заболеваний [13]. Нарушение этого баланса [14] может быть связано с полиморфизмами гена *CTLA4*, но не CD28. Действительно, продукт гена *CTLA4* играет важную роль в инициации, поддержании либо терминации аутоиммунного ответа в экспериментальных моделях на животных [15–17]. Независимыми исследованиями многократно показана ассоциация ряда полиморфных маркеров гена *CTLA4* с возникновением СД1 типа [18–20], болезни Грейвса [19, 21–23], аутоиммунного тиреоидита [21], множественного склероза и ряда других аутоиммунных процессов [24]. Причем носительство аллеля *G49*, ассоциированного с уменьшением торможения пролиферации Т-клеток [11], увеличивает риск возникновения аутоиммунных заболеваний.

Обнаружена этническая гетерогенность ассоциации *CTLA4* (*ITIM2*) с риском возникновения СД1 типа. Статистически достоверная ассоциация выявлена в 4 европейских популяциях (итальянцы, испанцы, французы, русские), мексикано-американской популяции и корейской; слабая ассоциация в европеоидной /North American/ и не обнаружена ассоциация в британской, сардинской и японской популяциях [25, 39]; данные исследований по китайской популяции не однозначны [20, 26].

В связи с существенным отличием монголоидной группы по частоте распространенности СД1 типа и клиническими особенностями течения заболевания изучение ассоциации высоко полиморфных генов *HLA* класса II (*DRB1*, *DQA1* и *DQB1*) и полиморфных маркеров гена *CTLA4* при СД1 типа у бурят представляет значительный интерес.

Проведенный анализ включал:

- идентификацию аллелей 3 генов локуса *HLA* класса II (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*) в двух группах бурят (больных СД1 и здоровых) с последующим определением диалетогенных гаплотипов;
- исследование диморфизмов гена *CTLA4* — *C(-318)T*, *A49G*, *C159G*, *C11T*, определение частот аллелей и генотипов указанных однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs — single nucleotide polymorphisms) в двух группах бурят (больных СД1 и здоровых) и поиск возможных ассоциаций этих SNP с развитием СД1 в данной популяции.

Объект и методы исследования

Все больные СД1 и лица контрольной группы относятся к бурятской популяции (монголоидная раса). В Республике Бурятия проживает около 300 тыс. бурят. Среди них к началу 2005 г. зарегистрировано 66 неродственных больных СД1. В представленной работе обследовано 64 из них и 10 больных СД1 бурятской национальности, проживающих в Усть-Ордынском Бурятском автономном округе. Все больные постоянно получают инсулин. Диагноз поставлен или подтвержден в клиниках Улан-Удэ и Иркутска. Возраст больных колеблется от 1 года до 40 лет. Возраст манифестации диабета от 3 мес. до 32 лет. Контрольная группа состояла из практически здоровых лиц (61 человек) без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним.

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводили по модифицированной методике Gemmell и Akiyama [27, 28].

Аллеи локуса *HLA* идентифицировали методом мультипраймерной полимеразной цепной реак-

Таблица 1

Использованные праймеры и рестриктазы		
SNP	Последовательность праймеров 5'-3'	Рестриктаза
<i>C(-318)T</i>	F GCCCAAGGGCTCAGAAAGTTAGCAG R GGAAGCCGTGGGTTAGCTGTTACG	Tru9I
<i>A49G</i>	F GCTCTACTTCCTGAAGACCT R AGTCTCACTCACCTTTCGACG	Fsp4HI
<i>C11T</i>	F TGGATCATGGGGGACTCATTGAATG R CTGACACCACCGCTGCCTCTCG	Bstc8I
<i>C159G</i>	F CCTGCCACAACCATCTTGAAGAATC R GTAGTATGGCGGTGGGTACACATGAGC	Bsc4I

ции, используя наборы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Типирование проводилось согласно регламенту производителя.

Идентификацию аллелей 4 полиморфных маркеров гена *CTLA4* проводили с помощью метода PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). Праймеры для анализа *C11T* и *C159G* разработаны с помощью программы Primer Primer 5.0. Типирование полиморфизмов *C(-318)T* и *A49G* проводили по [19, 29]. В табл. 1 представлены структура использованных праймеров и рестриктазы. Амплификацию проводили на многоканальном термоциклере «МС2» в составе смеси: 1хПЦР-буфер, 0,2γ геномной ДНК, 1U Taq-полимеразы, 20 пмоль каждого праймера, 8 ммоль dNTPs.

Идентификацию продуктов амплификации проводили после электрофореза в 2% агарозном геле и окрашивания продуктов амплификации бромистым этидием. Полученные ампликоны инкубировали с 5U соответствующей рестриктазы в течение 4–8 ч, продукты рестрикции разделяли электрофорезом в 2–3% агарозном геле.

Проведено сравнение частот аллелей и генотипов между двумя группами. Частоту аллелей определяли методом простого счета ($n/2N$, где n — число раз встречаемости аллеля (у гомозигот он учитывался дважды) в выборке N генотипов). Расчет трехлокусных гаплотипов выполняли при помощи компьютерной программы «Arlequin ver 2.000» (S.Schneider, D.Roessli, L.Excoffier). Предварительная проверка соблюдения закона Харди-Вайнберга проводилась для каждой группы (СД1, К) методом χ^2 .

Степень предрасположенности тех или иных аллелей к заболеванию определяли по величине показателя соотношения шансов (odds ratio — *OR*) по формуле [30]:

$$OR = \frac{(a+0.5)(d+0.5)}{(b+0.5)(c+0.5)},$$

где a — число лиц с наличием и b — с отсутствием данного аллеля среди больных пациентов, c и d — число лиц, соответственно, с наличием и отсутствием данного аллеля среди здоровых лиц; поправка «0,5» в этой формуле использовалась в случае малых выборок. $OR > 1$ рассматривали как положительную ассоциацию, $OR < 1$ — как отрицательную ассоциацию аллеля с заболеванием.

Статистическую достоверность отличия *OR* от 1 (p) определяли по методу χ^2 , в случае малых объемов групп — по точному двустороннему критерию Фишера для четырехпольных таблиц [31], вводили поправку Бонферрони при множественных сравнениях [31]. Расчеты выполняли при помощи компьютерных программ «Биостатистика», Microsoft Excel-97.

Таблица 2

Частота аллельных вариантов гена <i>DRB1</i> среди больных и в контрольной группе и риск развития СД1			
<i>DRB1</i> * аллели	Больные СД1 n=74	Контроль n=61	OR
01	0,060811	0,016393	3,88
03(17)	0,108108	0,073777	1,52
03(18)	0	0	
04	0,27027	0,172131	1,78
07	0,121622	0,098361	1,19
08	0,114865	0,04918	2,51
09	0,054054	0,040983	1,34
10	0,013514	0,02459	0,54
11	0,074324	0,131115	0,33*
12	0,040541	0,040983	0,82
13	0,114865	0,139344	0,86
14	0,0135135	0,065573	0,2
15	0,040541	0,139344	0,26**
16	0	0,008197	

* $p=0,025$; ** $p=0,007$

Таблица 3

Частота аллельных вариантов гена <i>DQA1</i> и риск развития СД1			
<i>DQA1</i> * аллели	Больные СД1 n=74	Контроль n=61	OR
0101	0,081081	0,090164	0,89
0102	0,074324	0,196721	0,36*
0103	0,047297	0,065574	0,71
0201	0,121621	0,098361	1,19
0301	0,385135	0,221311	2,2**
0401	0,040541	0,040984	0,99
0501	0,243243	0,286885	0,8
0601	0,006756	0	0,4

* $p=0,009$; ** $p=0,006$

Таблица 4

Частота аллельных вариантов гена <i>DQB1</i> и риск развития СД1			
<i>DQB1</i> * аллели	Больные СД1 n=74	Контроль n=61	OR
0201	0,243243	0,147541	1,86
0301	0,222973	0,311475	0,69
0302	0,148648	0,032787	5,15*
0303	0,081081	0,065574	0,99
0401/0402	0,101351	0,090164	1,14
501	0,074324	0,04918	1,55
0502/4	0	0,040984	0,16
503	0,006757	0,016393	0,4
0601	0,02027	0,032787	0,61
0602-8	0,101351	0,213115	0,42**

* $p=0,003$; ** $p=0,017$

Примечание.

Выведены аллели, наличие которых в генотипе статистически достоверно предрасполагает к развитию СД1 (протективные аллели - курсивом); n - количество обследованных; p - статистическая значимость отличия *OR* от 1.

Таблица 5

Частота распределения гаплотипов локуса HLA в 2 группах бурят

DRB1 *	Гаплотип		Больные СД1 n=148	Контроль n=122	OR	p
DQA1 *	DQB1 *					
01	0101	0501	0,061	0,016		
04	0301	0201	0,034	0,008		
04	0301	0301	0,081	0,098		
04	0301	0302	0,089	0,016	5,78	0,02
04	0301	04010/402	0,068	0,049		
07	0201	0201	0,095	0,074		
07	0201	0303	0,027	0,024		
08	0301	0302	0,061	0,008	7,83	0,05
08	0401	0401/0402	0,034	0,041		
09	0301	0303	0,054	0,041		
10	0101	0501	0,014	0,025		
11	0501	0301	0,047	0,123	0,35	0,04
12	0501	0301	0,041	0,041		
13	0102	0602-8	0,047	0,082		
13	0103	0602-8	0,027	0,032		
13	0501	0301	0,034	0,025		
14	0101	0503	0,007	0,016		
14	0101	0502/4	0	0,025		
14	0501	0301	0,007	0,016		
15	0102	0602-8	0,027	0,098	0,25	0,01
15	0103	0601	0,014	0,033		
17	0501	0201	0,108	0,074	1,52	0,1
	другие		0,028	0,032		

Примечание.

Приведены лишь те гаплотипы, частота которых >1% хотя бы в одной из групп. Выделены гаплотипы, предрасполагающие (протективные- курсивом) к развитию СД1 у бурят; n – количество гаплотипов; p – статистическая значимость.

Прогностическая значимость результатов выражается показателем PcPPV (Prevalence-corrected Positive Predictive Value), при вычислении которого учитывается распространенность СД1 в популяции (у бурят составляет 0,024%). Он означает вероятность для случайного представителя популяции, имеющего конкретный гаплотип, заболеть СД1 [32].

Результаты и их обсуждение

Распределение аллелей генов *HLA* (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*) в группах бурят, больных СД1, и здоровых индивидов представлено в табл. 2–4. Анализ распределения аллелей показал статистически значимые отличия в частотах аллелей *DRB1*15*, *DRB1*11*, *DQA1*0102*, *DQA1*0301*, *DQB1*0302*, *DQB1*0602-8*.

Частоты других аллелей генов *HLA* незначительно отличались у больных и здоровых индивидов или эти отличия не были достоверными.

В группе больных СД1 обнаружена повышенная частота аллеля *DQA1*0301* и пониженная частота аллеля *DQA1*0102* по сравнению с контрольной группой (*OR*=2,2 и *OR*=0,36 соответственно, *p*<0,01).

В гене *DQB1* выявлено достоверное (*p*<0,01) увеличение частоты аллеля *DQB1*0302* и уменьшение частоты аллеля *DQB1*0602-8* в группе больных СД1 (*OR*=5,2 и *OR*=0,42 соответственно).

В гене *DRB1* выявлено достоверное (*p*<0,01) уменьшение частоты аллелей *DRB1*15* и *DRB1*11* в группе больных СД1 (*OR*=0,26 и *OR*=0,33 соответственно).

Среди вычисленных показателей *OR* максимальное значение отмечено для аллеля *DQB1*0302* (*OR*=5,2; *p*=0,03). Такое значение *OR* однозначно свидетельствует о положительной ассоциации этого аллеля с СД1. При этом указанный аллель может рассматриваться как маркер предрасположенности к СД1. Минимальные значения *OR* показаны для аллелей *DRB1*15* и *DRB1*11* (*OR*=0,26 и 0,33 соответственно). Данные аллели являются протективными во многих популяциях.

В табл. 5 приведены частоты гаплотипов локуса *HLA*, составленных с помощью программы «Arlequin ver 2.000» и проверенных с помощью семейного анализа на 25 бурятских семьях (данные не приводятся). Сравнение частот гаплотипов локуса *HLA* в 2 группах бурят выявило статистически значимые различия в их распределении: гаплотипы

Таблица 6

PcPPV для четырех гаплотипов локуса HLA класса II в бурятской популяции

DRB1 *	Гаплотип DQA1 *	DQB1 *	Больные СД1 n=148	Контроль n=122	PcPPV
предрасполагающие					
04	0301	0302	0,089	0,016	0,0013
08	0301	0302	0,061	0,008	0,0018
x	0301	0302	0,149	0,024	0,0015
протективные					
11	0501	0301	0,047	0,123	0,00009
15	0102	0602-8	0,027	0,098	0,00006
x	0102	0602-8	0,081	0,18	0,0001
15	0102	x	0,027	0,107	0,00006

*DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302* и *DRB1*08 – DQA1*0301 – DQB1*0302* позитивно ассоциированы с СД1; гаплотип *DRB1*17 – DQA1*0501 – DQB1*0201* имеет слабовыраженную ассоциацию (в данной выборке недостоверную – $OR=1,52$ и $p=0,1$); гаплотипы *DRB1*11 – DQA1*0501 – DQB1*0301* и *DRB1*15 – DQA1*0102 – DQB1*0602-8* негативно ассоциированы с СД1 (как и во многих других популяциях). Обращает на себя внимание существенно более высокая предрасположенность к развитию СД1 у носителей гаплотипа *DRB1*08 – DQA1*0301 – DQB1*0302*, чем *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302* ($OR=7,83$ и $OR=5,78$ соответственно). Гаплотип *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302* в разной степени, но во многих популяциях позитивно ассоциирован с СД1. В бурятской популяции риск, сообщаемый этим гаплотипом, более 5. Однако частота его значительно ниже, чем в европеоидных популяциях (1,6% против ~10%), что представляет интерес в свете более низкой распространенности СД1 среди бурят. Кроме того, с *DQA1*0301 – DQB1*0302* могут быть сцеплены разные специфичности *DRB1*04*, сообщающие различную степень риска. В частности, аллель *DRB1*0403* вкуче с *DQA1*0301 – DQB1*0302* является слабо протективным, а аллели *DRB1*0401*, *DRB1*0402* и *DRB1*0405* – предрасполагающими.

Показано, что в японской популяции, где распространенность СД1 тоже очень низкая (0,6/100 000/год) [38], аллель *DRB1*0405* почти отсутствует. Субтипирование локуса *DRB1*04* с помощью методов высокого разрешения даст более точную картину распределения «классических» предрасполагающих гаплотипов в бурятской популяции.

Обнаруженная позитивная ассоциация гаплотипа *DRB1*08 – DQA1*0301 – DQB1*0302* с возникновением СД1 у бурят согласуется с данными о монголоидных популяциях, опубликованными сравнительно недавно [36,37]. Известно, что аллель *DRB1*0802* является предрасполагающим в японской популяции [36]. В статье [37] описаны исследования японской популяции, указывающие на гаплотип *DRB1*08 – DQB1*0302* как предрасполагающий к возникновению СД1 в детском возрасте ($OR=4,88$, $p=0,0017$).

Выявленные протективные гаплотипы *DRB1*11 – DQA1*0501 – DQB1*0301* и *DRB1*15 – DQA1*0102 – DQB1*0602-8* являются таковыми во многих популяциях.

В табл. 6 представлено значение PcPPV (Prevalence-corrected Positive Predictive Value) – вероятность для случайного представителя определенной популяции (с известной распространенностью СД1), имеющего конкретный гаплотип

Таблица 7

Распределение аллелей A49G гена CTLA4 в бурятской и других популяциях [по 19,23,33-35]

Аллель	Европеоиды [34] n=363	[19] n=325	Русские [33] n=153	Японцы [23] n=200	Китайцы [35] n=158	Буряты n=61
Частоты генотипов						
GG	7,8	12,6	32,3	39	48,1	42,62
AG	47,1	45,8		44	37,3	42,62
AA	45,1	41,5	26,9	17	14,6	14,75
Частоты аллелей						
G	31,4	35,5	52,7	61	66,8	63,93
A	68,6	64,5	47,3	39	33,2	36,06

тип, заболеть СД1. РсPPV рассчитали лишь для тех гаплотипов, различия распространенности которых в 2 группах бурят статистически значимы. Видно, что для случайного представителя бурятской популяции вероятность заболеть наименьшая в том случае, если он имеет гаплотип *DRB1*15 – DQA1*0102 – DQB1*0602-8* (в 6 случаях из 100 000), наибольшая – если он имеет гаплотип *DRB1*08 – DQA1*0301 – DQB1*0302* (~2 из 1000). При этом у первого риск заболеть в 30 раз ниже, чем у второго.

Статистический анализ распределения генотипов *HLA* класса II в 2 группах бурят не выявил значимых различий. Можно лишь сказать, что «классический» высоко предрасполагающий генотип *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302 / DRB1*17 – DQA1*0501 – DQB1*0201* в группе здоровых не наблюдается, а в группе больных частота его составляет 0,068 (~7%), тогда как в европеоидной группе больных СД1 частота его достигает 35%.

В табл. 7 представлено сравнение распределения аллелей полиморфного маркера *A49G* гена *CTLA4* в бурятской и других популяциях (контрольные группы). Аллели SNP *A49G* гена *CTLA4* в бурятской этнической группе распределены примерно так же, как и в японской и в китайской. В отличие от европейских популяций доминирующим аллелем в азиатских популяциях является аллель *49G*.

В табл. 8 представлено количество (и частоты в скобках) аллелей и генотипов SNP *A49G* в 2 группах бурят (здоровых – К и больных СД1). В группе пациентов обнаружено характерное для аутоиммунных заболеваний увеличение частоты аллеля *G* и генотипа *GG*. В группе больных СД1 частота генотипа *GG* (51,4%) выше, чем в контрольной группе (42,6%), однако данные статистически не достоверны ($p > 0,05$).

Стратификация исследованных групп по *HLA* гаплотипам не выявила значимых различий в распределении частот аллелей и генотипов *CTLA4* в бурятской популяции (данные не приводятся).

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов SNP *C11T* и SNP *A49G* показал, что они находятся в полном неравновесии по сцеплению.

У всех 135 исследованных бурят генотипу *49 AA* соответствовал генотип *11CC*, *49 AG – 11 CT*, *49 GG – 11 TT*.

Полиморфизм *159 C/G* в изученных группах не обнаружен. Либо этот нуклеотид мономорфен у бурят (в то время как в китайской популяции гетерозиготность его составляет 7,4 в контрольной группе и 10,3 в группе больных СД1 [26]), либо гетерозиготность его $\leq 0,7$. В этом случае сайт мало информативен для изучения ассоциаций. В распределении частот аллелей и геноти-

Таблица 8

Количество (и частоты, %) аллелей и генотипов полиморфного маркера <i>A49G</i> в двух группах бурят			
Показатель	СД1 (n=74)	К (n=61)	p
Частота аллеля			
A	41(27,7)	44(36,06)	0,18
G	107(72,3)	78(63,93)	0,18
Частота генотипа			
AA	5(6,76)	9(14,75)	0,272
AG	31(41,9)	26(42,62)	0,272
GG	38(51,4)	26(42,62)	0,272
Частота фенотипа			
AA+AG	36(48,65)	35(57,37)	0,402
GG+AG	69(93,24)	52(85,24)	0,217

Таблица 9

Количество (и частоты в скобках) аллелей полиморфного маркера <i>C(-318)T</i> в двух группах бурят			
Аллель	СД1 (n=74)	К (n=61)	p
C	138(0,93)	116(0,94)	0,93
T	10(0,067)	6(0,057)	

пов SNP *C(-318)T* значимых различий не выявлено ($p > 0,05$, табл. 9).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в бурятской популяции не наблюдается ассоциация сахарного диабета 1 типа с исследованными полиморфными маркерами гена *CTLA 4*.

Выводы

1. Гаплотип *DRB1*08 – DQA1*0301 – DQB1*0302* является гаплотипом, наиболее предрасполагающим к развитию СД1 типа в бурятской популяции ($OR=7,83$); гаплотип *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302* является гаплотипом, менее предрасполагающим к развитию СД1 типа в бурятской популяции ($OR=5,78$), тогда как в европеоидных популяциях данный гаплотип сообщает наибольший риск развития заболевания.

2. «Классический» высоко предрасполагающий генотип в европеоидных популяциях *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302 / DRB1*17 – DQA1*0501 – DQB1*0201* в группе здоровых бурят не наблюдается, а в группе больных частота его составляет 0,068 (~7%), тогда как в европеоидной группе больных СД1 частота его достигает 35%.

3. Аллели полиморфного маркера *A49G* гена *CTLA 4* в бурятской этнической группе распределены примерно так же, как и в японской и китайской популяциях. В отличие от европейских популяций доминирующим аллелем в азиатских популяциях является аллель *49G* (>60% против 30–50%).

4. Ассоциаций какого-либо из изученных полиморфных маркеров гена *CTLA 4* с предрасположенностью к СД1 в бурятской популяции не выявлено.

Литература

1. Todd J.A. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. // *Proc Nat Acad Sci USA*. - 1995-Vol. 92.-№19.-P.8560-8565.
2. Redondo M., Eisenbarth G. Genetic control of autoimmunity in Type 1 diabetes and associated disorders. // *Diabetologia*. - 2002- Vol. 45.-P.605-622.
3. S.Anjos, C.Polychronakos. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. // *Molecular Genetics and Metabolism*.-2004.- Vol.81.-P. 187-195.
4. Nerup J., Platts P., Anderson O.O. et al. HLA antigens and diabetes mellitus. // *Lancet*.-1974.-Vol.12.-P.864-866.
5. Park Y.S., Wang C.Y., Ko K.W. et al. Combinations of HLA DR and DQ molecules determine the susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Koreans. // *Hum. Immunol*. - 1998.- Vol.59.-P.794-801.
6. Redondo M.J., Fain P.R., Eisenbarth G.S. Genetics of Type 1A Diabetes // *Recent Prog Horm Res*.-2001.-Vol.56.-P.69-89.
7. Осокина И.В., Болдырева М.Н., Ширшина Р.К., Гуськова И.А., Богатова О.В., Грудакова Е.Г., Кабдулова Д. О., Алексеев Л.П.. // *Сахарный диабет*.-2001-№ 4.-С.8-9.
8. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, et al. . A review of the recent epidemiological data on incidence of type 1 diabetes mellitus world wide. // *Diabetologia* - 1993- Vol.36.-P. 883-892.
9. Boldyreva M., Trofimov D., Guskova I., Demidova I., Zilov A., Dedov I., Alexeev L. HLA genetic markers of IDDM in buriat population. // *Human Immunology*. - 1996.-Vol.1.47.-№1-2.-P.156.
10. Алексеев Л.П., Дедов И.И., Зилов А.В., Болдырева М.Н., Демидов И.Ю., Трофимов Д.Ю., Хаитов Р.М. // *Сахарный диабет*.-1999-№1.- С.19-21.
11. Biancone L., Deambrosio I., Camussi G. Lymphocyte costimulatory receptors in renal disease and transplantation. // *J. Nephrol*.- 2002-Vol.15.-P.7-16.
12. J.G.Gribben, G.J.Freeman, V.A.Boussiotis et al. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. // *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. -1995- Vol.92.-P. 811-815.
13. Amundsen S., Nalwai A, Ascher H. et al. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. // *Tissue Antigens*.- 2004-Vol.64.-P.593-599.
14. Ahmed S., Ihara K., Nakashima H. et al. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. // *Rheumatology*. - 2001-Vol. 40.-P. 662-7.
15. Luhder F., Chambers C., Allison J.P. et al. Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. // *PNAS USA*.- 2000-P. 12204-12209.
16. Luhder F., Hoglund P., Allison J.P. et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. // *J.Exp.Med*. -1998-Vol.187.-P. 427-432.
17. Karandikar N.J., Eagar T.N., Vanderlugt C.L. et al. CTLA-4 downregulates epitope spreading and mediates remission in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Neuroimmunol*. -2000- Vol.109.-P.173-180.
18. Nistico L., Buzzetti R., Pritchard L. et al. The CTLA4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. // *Hum. Mol. Genet*. - 1996-Vol. 5.-P. 1975-80.
19. Donner H., Rau H., Walfish P. et al. CTLA4 alanin-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. // *J. Clin. Endocrinol. Metab*. - 1997-Vol. 82.-P. 143-146.
20. Marron M., Raffel L., Garchon H. et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. // *Hum. Mol. Genet*.-1997-Vol. 6.-P. 1275-1282.
21. Kotsa K., Watson P. A CTLA4 gene polymorphism is associated with both Graves' disease and autoimmune hypothyroidism. // *Clin. Endocrinol*.- 1997-Vol. 46.-P.551-554.
22. Kouki T., Sawai Y., Gardine C. et al. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. // *J. Immunol*.- 2000- Vol. 165. -P.6606-611.
23. Yanagawa T., Taniyama M., Enomoto S. et al. CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. // *Thyroid* .-1997-Vol. 7.-P. 843-846.
24. Harbo H., Celius E., Vartdal F. et al. CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. // *Tissue Antigens*.- 1999-Vol.1.-P. 106-110.
25. Yanagawa T., Kristiansen O., Mato E. et al. Lack of association between CTLA4 gene polymorphism and IDDM in Japanese subjects. // *Autoimmunity*.- 1999.-Vol.29.-P.53-57.
26. Osei-Hyiaman D., Hou L., Zhiyin R. et al. Association of a novel point mutation (C159G) of the CTLA4 gene with Type 1 Diabetes in West Africans but not in Chinese. // *Diabetes*.- 2001.-Vol.50.-P. 2169-2171.
27. Анализ генома. Методы. // Пер. с англ./Под редакцией К.Дейвиса. - М.: Мир, 1990. -246с.
28. Ezquieta B., Jariego C., Varela J.M. et al. Microsatellite markers in the indirect analysis of the steroid 21-hydroxylase gene. // *Prenat. Diagn*. - 1997. - Vol. 17(5). -P.429-434.
29. Liu M.-F., Wang C.-R., Chen P.-C. et al. Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. // *Scandinavian J of Immunol*.- 2003.- Vol. 57(6).-P. 568-72.
30. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. // *Am. Hum. Genet*.-1955.-Vol9.-P.251.
31. Стентон Гланц. Медико-биологическая статистика. // Практика. Москва 1999.
32. M.Zamani, J.-J.Cassiman. Reevaluation of the Importance of Polymorphic HLA Class II Alleles and Amino Acids in the Susceptibility of Individuals of Different Populations to Type 1 Diabetes. // *Am. J. of Medical Genetics*.- 1998.- Vol76.-P.183-194.
33. Савостьянов К.В., Чистяков Д.А., Петунина И.А. и др. Генетическая предрасположенность к развитию диффузного токсического зоба в популяции Москвы. // *Проблемы эндокринологии*.-2004.-Т.50 №6, стр. 10-13.
34. Heward J., Allahabadia A., Armitage M., et al. The development of Graves' disease and the CTLA4 gene on chromosome 2q33. // *J of Clin Endocrinol and metabol*.- 1999.-Vol.84.-P.2398-2401.
35. E. Yung, P. S. Cheng, T. F. Fok et al. CTLA-4 gene A-G polymorphism and childhood Graves' disease. // *Clinical Endocrinology*.-2002.-Vol.56.-P.649-653.
36. T.Awata, Y.Kanazawz. Genetic marker for insulin-dependent diabetes mellitus in Japanese. // *Diabetes Res and Clin Pract*.-1994.-Vol. 24.-P.83-87.
37. S.Murao, H.Makino, Y.Kaino et al. Differences in the Contribution of HLA-DR and -DQ Haplotypes to Susceptibility to Adult- and Childhood-Onset Type 1 Diabetes in Japanese Patients. // *Diabetes*.- 2004.-Vol.53.-P. 2684-2690.
38. DERI Group (Diabetes Epidemiology Research International Group). Geographical patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. // *Diabetes*.- 1988.-Vol.37.-P.1113-1119.
39. Chistiakov D.A., Savostanov K.V., Nosikov V.V. CTLA4 gene polymorphisms are associated with, and linked to, insulin-dependent diabetes mellitus in a Russian population. // *BMC Genetics*.-2001. -Vol.2(1). -P. 6-10.