

Прогнозирование СД 1 типа в группах высокого риска

Т.В.Никонова, И.И. Дедов, Л.П. Алексеев, М.Н. Болдырева, О.М. Смирнова, И.В. Дубинкин*.

Эндокринологический научный центр
(дир. — акад. РАМН И.И.Дедов) РАМН,
*ГНЦ “Институт иммунологии”

(дир. - акад. РАМН Р.М. Хаитов) МЗ РФ, Москва.

В настоящее время наблюдается рост заболеваемости СД 1 типа во всем мире. Это обусловлено рядом факторов, в том числе увеличением продолжительности жизни больных диабетом вследствие улучшения диагностической и лечебной помощи, повышением фертильности и ухудшением экологических ситуаций. Уменьшить заболеваемость СД можно проведением профилактических мероприятий, прогнозированием и предупреждением развития болезни.

Предрасположенность к СД 1 типа генетически детерминирована [1, 12, 23, 32]. Заболеваемость СД 1 типа контролируется рядом генов: геном инсулина на хромосоме 11p15.5 (IDDM2), генами на хромосоме 11q (IDDM4), 6q (IDDM5) [12, 22, 23, 32]. Наибольшее значение из известных генетических маркеров СД 1 типа имеют гены области HLA на хромосоме 6p21.3 (IDDM1); с ними связано до 40% генетической предрасположенности к СД 1 типа [8, 9, 20, 31]. Ни одна другая генетическая область не определяет риск развития заболевания, сравнимый с HLA.

Высокий риск развития СД 1 типа определяют аллельные варианты генов HLA: DRB1*03,*04; DQA1*0501,*0301, DQB1*0201,*0302 [9, 20, 24]. 95% пациентов с 1 типом СД имеют DR*3 или DR*4 антигены, а от 55 до 60% имеют оба антигена [21, 28, 35]. Аллель DQB1*0602 редко встречается при СД 1 типа и считается протективным [25].

Клиническим проявлениям СД предшествует латентный период, характеризующийся присутствием маркеров островкового клеточного иммунитета [29]; эти маркеры ассоциированы с прогрессирующей деструкцией β -клеток. Наличие генетических и иммунологических маркеров делает возможным проведение плановых исследований по доклинической диагностике СД 1 типа.

Наибольшее значение из известных типов аутоантител, являющихся иммунологическими маркерами [5] СД 1 типа, имеют антитела к глутаматдекарбоксилазе (ГДК) и цитоплазме островковых клеток (АЦОК). Эти антитела высоко специфичны по отношению к β -клеткам, выявляются за несколько лет до появления первых симптомов СД. Антитела к ГДК обнаруживаются в эксперименте одновременно с развитием инсулита. АЦОК присутствуют в сыворот-

ке крови у 69-90% пациентов с впервые выявленным СД. У лиц без диабета с высоким титром АЦОК ежегодный риск развития заболевания составляет 9-10% [37] и даже 45% [27]. В общей популяции положительные титры АЦОК обнаруживаются редко; в Германии они выявлялись лишь у 1,05% школьников [6], в Швеции - у 3% детей до 14 лет [15].

В 1990 г. ГДК (белок 64kd) идентифицирована как один из основных антигенов при СД 1 типа [18]. По данным ряда авторов [2], у 5 из 7 детей, имеющих положительный титр антител к ГДК, развивается СД; 75% пациентов с СД 1 типа имеют антитела к ГДК; наличие аутоантител на предиабетической стадии достаточно стабильно (80%). Возможно, определение антител к ГДК является методом выбора при прогнозировании СД 1 типа (специфичность тестов достигает 100%) [3].

Риск развития СД взаимосвязан с количеством вариантов присутствующих маркерных антител. В исследованиях [10] показано, что комбинация двух и более видов антител представляет более эффективный уровень прогнозирования, чем наличие только одного вида антител.

В настоящее время рассматриваются два подхода к прогнозированию СД 1 типа [10] - прогнозирование в популяции с определением антител и прогнозирование в семьях с учетом генетической предрасположенности.

Во Франции кумулятивный риск заболевания СД 1 типа в общей популяции в возрасте до 20 лет составляет 0,1%, а у родственников больных СД I степени родства в возрасте до 20 лет - 6,1%, т.е. в 60 раз превышает риск заболевания в популяции в целом [17]. В Дании кумулятивный риск для сибсов в возрасте до 30 лет составляет 6,4%, для потомков в возрасте до 34 лет - 6,3% [18]. В ряде других исследований заболевание родственников I степени родства колеблется от 5 до 19% [7, 30].

Таким образом, для членов семей с предшествующими случаями заболевания СД 1 типа прогнозирование болезни является особенно важным.

Целью настоящей работы явилось формирование групп высокого риска развития СД 1 типа в русской популяции жителей Москвы на основе изучения генетических, иммунологических и метаболических маркеров диабета с использованием семейного подхода.

Материалы и методы исследования

Обследовано 26 семей, в которых один из родителей болен СД 1 типа, из них 5 - "ядерных" семей (всего 101 человек). Количество обследованных членов семей колебалось от 3 до 10 человек. Больных СД 1 типа отцов - 13, больных СД 1 типа матерей также 13. Семей, в которых оба родителя были бы больны СД 1 типа, не было.

Обследовано 37 потомков больных СД 1 типа без клинических проявлений заболевания, из них 16 - женского пола, 21 - мужского. Возраст обследованных потомков колебался от 5 до 30 лет. Распределение обследованных потомков по возрасту представлено в табл. 1.

Таблица 1

Возраст обследованных детей (потомков)

Возраст (лет)	Количество
0-4	0
5-9	12
10-15	17
16-19	5
20-24	1
25-30	2

В семьях с больными СД матерями обследовано 17 детей (8 девочек, 9 мальчиков), в семьях с больными диабетом отцами - 20 детей (8 девочек, 12 мальчиков).

Аутоантитела к β -клеткам (ICA) определяли двумя способами: 1) на криосрезах поджелудочной железы человека I (0) группы крови в реакции непрямой иммунофлуоресценции; 2) в иммуноферментном тесте "ISLETTEST" фирмы "Biomerica". Аутоантитела к инсулину (IAA) определяли в иммуноферментном тесте "ISLETTEST" фирмы "Biomerica". Определение антител к ГДК проводилось с помощью стандартных наборов "Diaplets anti-GAD" фирмы "Boehringer Mannheim".

Определение С-пептида проведено с помощью стандартных наборов фирмы "Sorrin" (Франция).

HLA-типирование больных СД и членов их семей выполнялось по трем генам: DRB1, DQA1 и DQB1 методом сиквенс-специфических праймеров с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови проводили по методу R. Higuchi H. Erlich (1989) с некоторыми модификациями: 0,5 мл крови, взятой с EDTA, смешивали в 1,5 мл микроцентрифужных пробирках типа Эппендорф с 0,5 мл лизирующего раствора, состоящего из 0,32 М сахарозы, 10 мМ Трис - HCl pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 1% Тритона X-100, центрифугировали в течение 1 мин при 10000 об/мин, супернатант удаляли, а осадки клеточных ядер 2 раза промывали указанным буфером. Последующий протеолиз проводили в 50 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ KCl, 10 мМ Трис-HCl pH 8,3, 2,5 мМ MgCl₂, 0,45% NP-40, 0,45% Твина-20 и 250 мкг/мл протеиназы К при 37°C в течение 20 мин. Инактивировали протеиназу К нагреванием в твердотельном термостате при 95°C в течение 5 мин. Полученные образцы ДНК сразу использовали для типирования либо хранили при -20°C. Концентрация ДНК, определенная по

флуоресценции с Hoechst 33258 на ДНК-флуориметре (Hoefer, США), составляла в среднем 50-100 мкг/мл. Общее время процедуры выделения ДНК составляло 30-40 мин.

ПЦР проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл образца ДНК и следующие концентрации остальных компонентов: 0,2 мМ каждого дНТФ (дАТФ, дЦТФ, дТТФ и дГТФ), 67 мМ Трис-HCl pH=8,8, 2,5 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 0,1 мг/мл желатина, 1 мМ 2-меркаптоэтанола, а также 1 ед термостабильной ДНК-полимеразы. Для предотвращения изменения концентраций компонентов реакционной смеси из-за образования конденсата реакционную смесь покрывали 20 мкл минерального масла (Sigma, USA).

Аmplификацию проводили на многоканальном термощиклере "MC2" (АО "ДНК-Технология", Москва).

Типирование локуса DRB1 проводили в 2 этапа. Во время 1-го раунда геномная ДНК амплифицировалась в двух различных пробирках [11]; в 1-й пробирке использовалась пара праймеров, амплифицирующая все известные аллели гена DRB1, во 2-й - пара праймеров, амплифицирующая только аллели, входящие в группы DR3, DR5, DR6, DR8. В обоих случаях температурный режим амплификации (для термощиклера "MC2" с активным регулированием) был следующим: 1) 94°C - 1 мин.; 2) 94°C - 20 с (7 циклов), 67°C - 2 с; 92°C - 1 с (28 циклов); 65°C - 2 с.

Полученные продукты развели в 10 раз и использовали на 2-м раунде при следующем температурном режиме: 92°C - 1 с (15 циклов); 64°C - 1 с.

Типирование локуса DQA1 проводилось в 2 этапа. На 1-м этапе использовалась пара праймеров, амплифицирующая все специфичности локуса DQA1, на 2-м - пары праймеров, амплифицирующие специфичности *0101, *0102, *0103, *0201, *0301, *0401, *0501, *0601.

Первый этап проводили по программе: 94°C - 1 мин.; 94°C - 20 с (7 циклов), 58°C - 5 с; 92°C - 1 с, 5 с (28 циклов), 56°C - 2 с.

Продукты амплификации 1-го этапа развели в 10 раз и использовали на 2-м этапе: 93°C - 1 с (12 циклов), 62°C - 2 с.

Типирование локуса DQB1 также проводилось в 2 этапа; на 1-м использовали пару праймеров, амплифицирующую все специфичности локуса DQB1, температурный режим следующий: 94°C - 1 мин.; 94°C - 20 с. (7 циклов); 67°C - 5 с.; 93°C - 1 с (28 циклов); 65°C - 2 с.

На 2-м этапе использовали пары праймеров, амплифицирующие специфичности: *0201, *0301, *0302, *0303, *0304, *0305, *04, *0501, *0502, *0503, *0601, *0602/08; продукты 1-го этапа развели в 10 раз и проводили амплификацию в режиме: 93°C - 1 с. (12 циклов); 67°C - 2 с.

Идентификацию продуктов амплификации и их распределение по длинам проводили в ультрафиолетовом свете (310 нм) после электрофореза в течение 15 мин либо в 10% ПААГ, 29:1 при напряжении 500В, либо в 3% агарозном геле при напряжении 300 В (в обоих случаях пробег составлял 3-4 см) и окрашивания бромистым этидием. В качестве маркера длин использовали перевар плазмиды pUC19 рестриктазой Msp I.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что в 26 семьях из 26 больных СД 1 типа родителей 23 человека (88,5%) являются носителями ассоциированных с СД 1 типа HLA-генотипов DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201; DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 или их сочетаний (табл. 2). У 2 больных в генотипе присутствует аллель DQB1*0201, ассоциированный с СД 1 типа; только у 1 больной этой группы обнаружен генотип DRB1*01/01, кото-

Таблица 2

Распределение генотипов среди больных СД 1 типа родителей

Генотипы, ассоциированные с СД 1 типа		Число носителей	Генотипы, не ассоциированные с СД 1 типа		Число носителей
DRB 1	3/3	1	DRB 1	1/7	2
	3/4	8		1/1	1
	4/4	2		-	-
	3/X	5		-	-
	4/X	7		-	-
Всего		23 (88.5%)	Всего		3

DRB1- DQA1- DQB1 гаплотипы, обнаруженные у обследованных лиц

DRB1	DQA1	DQB1
03	0501	0201
04	0301	0302
07	0201	0201
01	0101	0501
11	0501	0301
13	0103	0602-8
15	0102	0602-8
16	0102	0502/4

рый при популяционных исследованиях не был ассоциирован с СД 1 типа, мы не выделяли подтипы DRB1*04, хотя полиморфизм этого локуса может влиять на риск развития СД 1 типа [9, 34].

При генотипировании прямых потомков пациентов с СД 1 типа выявлено, что из 37 человек 30 (81%) унаследовали ассоциированные с СД 1 типа генотипы DRB1*03, DRB1*04 и их сочетание, у 3 лиц в генотипе присутствуют ассоциированные с СД 1 типа аллели: у 1 - DQA1*0501, у 2 пациентов - DQB1*0201. Всего 4 из 37 обследованных имеют нейтральный генотип по отношению к СД 1 типа.

Распределение генотипов потомков указаны в табл. 3. В ряде работ отмечено, что больные СД 1 типа отцы чаще передают генетическую предраспо-

ложенность к диабету (в частности, HLA-DR4-генотипы) своим детям, чем матери [7, 19]. Однако исследование в Великобритании не подтвердило существенного влияния пола родителей на HLA-зависимую предрасположенность у детей [4]. В нашей работе мы также не можем отметить подобной закономерности передачи генетической предрасположенности: от больных матерей ассоциированные с СД 1 типа HLA-генотипы унаследовали 94% детей и от больных отцов - 85%.

СД, как известно, является мультигенным многофакторным заболеванием. В качестве факторов внешней среды, играющих роль триггера, рассматривается питание - потребление в грудном возрасте и раннем детстве белков коровьего молока [13]. Де-

Таблица 3

Распределение генотипов среди детей, родители которых больны СД 1 типа

Генотипы, ассоциированные с СД 1 типа		Число носителей	Генотипы, не ассоциированные с СД 1 типа		Число носителей
DRB 1	3/3	2	DRB 1	1/7	2
	4/3	4		1/13	1
	4/4	4		1/15	1
	3/X	12		1/1	1
	4/X	8		16/16	1
Всего		30 (81%)	Всего		7 (19%)

ти с вновь выявленным диабетом имеют повышенные уровни антител к белку коровьего молока, β -лактоглобулину и бычьему сывороточному альбумину [26] по сравнению со здоровыми sibсами, что расценивается как независимый фактор риска развития СД.

В группе обследуемых детей из 37 человек только 4 были на грудном вскармливании до 1 года, 26 человек получали грудное молоко до 1,5 - 3 мес, 4 - до 6 мес, 3 были на молочных смесях с первых недель жизни. Из 5 детей с положительными антителами к β -клеткам 2 были на грудном вскармливании до 6 мес, 3 - до 1,5 - 3 мес; затем получали кефир и молочные смеси. Таким образом, 89% обследованных детей получали белки коровьего молока в грудном возрасте и раннем детстве, что может быть расценено как фактор риска развития СД у генетически предрасположенных лиц.

В обследуемых семьях у клинически здоровых потомков проведено определение цитоплазматических антител, аутоантител к инсулину и ГДК. Из 37 обследованных 5 детей оказались положительными по наличию антител к β -клеткам, при этом все 5 являются носителями генетической предрасположенности к СД (табл. 4). У 3 из них (8%) обнаружены антитела к ГДК, у 1 - к АЦОК, у 1 - антитела к АЦОК

Таблица 4

Генотипы детей, положительных по антителам к β -клеткам

Генотип	Число положительных по антителам детей	
	ГДК	АЦОК
DR 3/4	2	0
DR 4/X	1	1
DR 3/X	0	1

и инсулину. Таким образом, антитела к АЦОК имеют 5,4% детей, 2 ребенка с положительными антителами к ГДК являются потомками «ядерных» семей. Возраст детей на момент выявления антител указан в табл. 5. Для прогнозирования СД большое значение имеют уровни титра АЦОК: чем выше титр антител, тем больше вероятность развития СД, то же касается и антител к инсулину [16]. По данным литературы [11], высокие уровни антител к ГДК ассоциированы с более медленным темпом развития СД (10% в 4 года), чем низкие уровни (50% в 4 года), возможно, потому, что высокие уровни антител к ГДК указывают на «предпочтительную» активацию гуморального иммунитета и в меньшей степени на активацию клеточно-опосредо-

Таблица 5

Возраст обследованных детей на момент выявления антител

Возраст обследованных детей (лет)	Число детей, положительных по антителам
5-9	1
10-15	3
16-19	1
20-24	0
25-30	0
Всего...	5

ванного иммунитета (СД 1 типа главным образом обусловлен клеточно-опосредованной деструкцией β -клеток цитотоксическими Т-лимфоцитами). Комбинация различных антител обеспечивает наиболее оптимальный уровень прогнозирования.

У детей с низкой массой тела при рождении (менее 2,5 кг) диабет развивается значительно раньше, чем у детей, родившихся с нормальной массой [14]. Из данных анамнеза обращает на себя внимание то, что из 5 детей с положительными антителами 2 родились с массой тела более 4 кг, 2 - менее 2,9 кг.

У прямых потомков больных СД 1 типа определен базальный уровень С-пептида, у всех этот показатель был в пределах нормы (в том числе и у детей с положительными антителами к β -клеткам), исследование уровня стимулированного С-пептида не проводилось.

Выводы

1. Больные СД 1 типа в 88,5% случаев являются носителями генотипов DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201, DRB1*04, DQA1*0301, DQB1*0302, или их сочетаний.

2. У детей из семей, где один из родителей болен СД 1 типа, в 89% случаев выявляется генетическая предрасположенность к СД (при наличии одного больного родителя), при этом 81% наследует полностью ассоциированные с СД 1 типа генотипы, что позволяет считать их группой очень высокого риска развития диабета.

3. Среди прямых потомков больных СД 1 типа, имеющих генетическую предрасположенность, положительные антитела к ГДК выявлены в 8% случаев, АЦОК - в 5,4% случаев. У этих детей необходимо диагностическое исследование титров антител, гликогемоглобина и изучение секреции инсулина.

Литература

1. Atkinson M.A., McLaren N.K. // *N.Engl.J.Med.*-1994 -331. P.1428-1436.
2. Aanstoot H.J., Sigurdsson E., Jaffe M. et al // *Diabetologia*-1994-37. P.917-924.
3. Baekkeskov S., Aanstoot H.J., Christgan S. et al // *Nature*-1990-377. P.151-156.
4. Bain S.C., Rowe B.R., Barnett A.H., Todd J.A. // *Diabetes*-1994-43(12). P.1432-1468.
5. Bingley P.J., Christie M.R., Bonifacio E., Bonfanti R., Shattock M., Fonte M.T., Bottazzo G.F. // *Diabetes*-1994-43. P.1304-1310.
6. Boehn B.O., Manifras B., Seibler J. et al // *Diabetes*-1991-40. P.1435-1439.
7. Chern M.M., Anderson V.E., Barbosa J. // *Diabetes*-1982-31. P.1115-1118.
8. Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T. et al. // *Nature*-1994-371. P.130-136.
9. Erlich H.A., Rotter J.I., Chang J. et al. // *Nature Gen.*-1993-3. P.358-364.
10. Hahl J., Simell T., Ilonen J., Knip M., Simmel O. // *Diabetologia*-1998-41. P.79-85.
11. Harrison L.C., Honeyman M.C., DeAizpurua H.J. et al // *Lancet*-1993-341. P.1365-1369.
12. Hashimoto L., Habita C., Beresse J.P. et al. // *Nature*-1994-371. P.161-164.
13. Karjalainen J., Martin J.M., Knip M. et al // *N.Engl.J.Med.*-1992-327. P.302-303.
14. Khan N., Couper T.T. // *Diabetes Care*-1994-17. P. 653-656.
15. Landin-Olsson M., Palmer J.P., Lernmark A. et al // *Diabetologia*-1992-40. P.1068-1073.
16. Leslie R.D.G., Atkinson M.A., Notkins A.L. // *Diabetologia*-1999-42. P.3-14.
17. Levy-Marchal C., Dubois F., Neel M., Tichet J., Czernichow P. // *Diabetes*-1995-44. P.1029-1032.
18. Lorenzen T., Pociot F., Hougaard P., Nerup J. // *Diabetologia*-1994-37. P.321-321.
19. Lorenzen T., Pociot F., Stilgren L. et al // *Diabetologia*-1998-41. P.666-673.
20. Nepom G., Erlich H.A. // *Ann.Rev.Immunol.*-1991-9. P.493-525.
21. Nerup J., Mandrup-Poulsen T., Molvig J. // *Diabetes Metab. Rev.*-1987-3. P.779-802.
22. Owerbach D., Gabbay K.H. // *Diabetes*-1995-44.p.132-136.
23. Pociot F. // *Dan.Med.Bull.*-1996-43. P.216-248.
24. Rewers M., Bugawan T.L., Norris J.M., Blair A. et al. // *Diabetologia*-1996-39. P.807-812.
25. Reijonen H., Ilonen J., Knip N., Akerblom H. // *Diabetes*-1991-40. P.1640-1644.
26. Saukkonen T., Virtanen S.M., Karppinen M. et al // *Diabetologia*-1998-41. P.72-78.
27. Schatz D., Krischer J., Horne G. et al // *J. Clin. Invest.*-1994-93. P.2403-2407.
28. Spielman R.S., Baker L., Zmijewski C.M. // *Ann. Hum. Genet.*-1980-44. P.135-150.
29. Thivolet C., Beaufre B., Gebuhrer Y., Chatelain P., Orgiazzi J. // *Diabetologia*-1991-34. P.186-191.
30. Tillil H., Kobberling J. // *Diabetes*-1982-36. P.93-99.
31. Todd J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*-1990-377. P.8560-8565.
32. Todd J.A., Farral M. // *Hum.Mol.Gen.*-5. P.1443-1448.
33. Tuomilehto J., Zimmet P., Mackay I.R. et al // *Lancet*-1994-343. P.1383-1385.
34. Van der Anvera B., Van Waeyenberge C., Schuit F. et al. // *Diabetes*-1995-44. P.527-530.
35. Walker A., Gudworth A.G. // *Diabetes*-1980-29. P.1036-1039.
36. Warram J., Krolewski A.S., Gottlieb M., Kahn C.R. // *N.Engl.J.Med.*-1984-311. P.149-151.
37. Ziegler A.G., Herskowitz R.D., Jackson R.A. et al // *Diabetes Care*-1990-13. P.762-775.