

Возможности прогнозирования инсулинзависимого сахарного диабета в семьях больных на основе исследования генетических маркеров

Т.Л. Кураева, В.А. Петеркова, *В.В. Носиков, *А.С. Сергеев, И.И. Дедов

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

*Государственный научный центр "Гос НИИ Генетика"
(дир. - член-корр. РАН В.Г. Дебабов), Москва

В основе ИЗСД лежит абсолютная инсулиновая недостаточность, развивающаяся в результате аутоиммунного разрушения островковых β -клеток у генетически предрасположенных индивидуумов. В настоящее время ИЗСД рассматривается как многофакторное заболевание, причинами развития которого являются как факторы внешней среды, так и генетическая предрасположенность.

В геноме человека были идентифицированы два локуса, связанные с предрасположенностью к развитию ИЗСД: locus HLA, расположенный на хромосоме 6p21.3, и область, расположенная на хромосоме 11p15.5, в которую входит ген инсулина. Эти два локуса получили обозначения IDDM1 и IDDM2 соответственно, и они определяют около 40% от общего генетического риска развития ИЗСД [2].

Хорошо известна связь ИЗСД с DR, DP и DQ-антигенами системы HLA. В последние годы обнаружена ассоциация этого заболевания с различными аллелями генов HLA-DQA1/B1. Предпринимаются попытки прогнозирования развития сахарного диабета на основании комплексных иммунологических, иммуногенетических и гормональных исследований. Однако значение генетических факторов в повышении прогностической ценности этих исследований пока изучено недостаточно. Кроме того, принимая во внимание популяционные различия в частоте встречаемости антигенов HLA-системы, оценка риска должна быть уточнена для каждой популяции. Для русской популяции эти исследования проведены впервые.

Целью настоящей работы было изучение возможности генетического прогнозирования ИЗСД в семьях русской популяции на основе исследования генетических маркеров, ассоциирующихся с сахарным диабетом.

Определение HLA-антигенов классов I, II (A, B и DR) и полиморфных аллелей генов HLA-DQ проведено у 480 человек русской национальности: больных случайной выборки (145 человек), здоровых (121 человек) и в 26 ядерных семьях, конкордантных по ИЗСД, с двумя и более больными sibсами, и в 20 семьях с дискордантными по ИЗСД sibсами. Возраст больных колебался от 2 до 43 лет. Возраст манифестации диабета был от 1 года до 32 лет.

Для выявления антигенов HLA - A, B и DR использовались сыворотки из коллекции Санкт-Петербургского НИИ гематологии и переливания крови МЗ РФ с включением коммерческих сывороток фирм "Boerhing" и "Pel-Freez" и сывороток из коллекции XI заседания международной Рабочей группы по гистосовместимости. Полная или обогащенная суспензия лимфоцитов получена методом, основанным на элиминации Е-розеткообразующих клеток с использованием эритроцитов барана, обработанных нейтромицидазой.

Типирование аллельных вариантов генов HLA DQA1 и DQB1 проводилось методом полимеразной цепной реакции с последующей гибридизацией фрагментов с олигонуклеотидными зондами, специфичными к определенным аллелям.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью компьютерных программ, разработанных А.С. Сергеевым (Медико-генетический научный центр РАМН). Сравнение частот маркерных генов проводили с помощью t-критерия Стьюдента или по критерию X. При малочисленных выборках использовался критерий X с коррекцией Йетса на непрерывность выборки либо применялся "точный" метод Фишера для четырехпольных таблиц. Относительный риск (RR) рассчитывали по формуле:

$$RR = \frac{(a+0,5)(d+0,5)}{(b+0,5)(c+0,5)},$$

где a – число лиц с наличием и b – с отсутствием данного маркера среди больных; c и d – число лиц с наличием и отсутствием соответственно данного маркера среди здоровых, параметр 0,5 использовался как поправка на малочисленность выборки.

Абсолютный риск, т.е. условную вероятность развития заболевания у лиц, носителей данного генетического маркера или их комбинаций, рассчитывали по методу Байеса:

$$Ar(D/Gi) = \frac{OP(Gi/D)P(D)}{P(Gi/D)P(D) + [1-P(D)]P(Gi/D)},$$

где $Ar(D/Gi)$ – вероятность развития заболевания, условная по носительству данного гена (генотипа), т.е. абсолютный риск;

$OP(Gi/D)$ – частота генотипа Gi по данным опыта;

$P(Gi/D)$ – частота генотипа Gi у здоровых;

$P(D)$ – риск развития заболевания в популяции (безусловный).

Анализ семейного материала по гаплоидентичности sibсов проводился методом пораженных sibсовых пар с использованием условно вероятностного подхода [1].

Повторный риск развития СД для пар sibсов в зависимости от их конкордантности по генетическим маркерам (гаплотипам) рассчитан на основании метода эмпирической оценки, разработанного Сергеевым А.С.

Метод основан на комбинаторном анализе распределения гаплотипов с помощью “конвертирующих” коэффициентов, с использованием условно-вероятностного подхода. При этом на основе данных по общему повторному риску (не дифференцированному по гаплотипам) проводится коррекция соотношения объемов выборок конкордантных и дискордантных по заболеванию семей.

При анализе полученных данных выявлены существенные отклонения в распределении HLA-антиге-

нов при ИЗСД. Обнаружено статистически достоверное повышение частоты B16 (25,0% против 5,7%, $p < 0,01$), DR4 (51,7% против 19,1%, $p < 0,01$) и гетерозиготы DR3/DR4 (24,1% против 2%, $p < 0,01$). Обнаружена также отчетливая тенденция к снижению DR2 у больных ИЗСД (0,7% против 35,6%).

Однако антигены DR3 и DR4 не являются сильными генетическими маркерами, поскольку более 50% здоровых людей имеют один или другой антиген или их комбинацию. В современной научной литературе имеются сообщения о том, что ассоциации с DR-антигенами могут быть вторичными по отношению к DQ-антигенам. Оказалось, что гены подлокуса HLA-DQ более тесно сцеплены с ИЗСД, чем гены DR. Кроме того, в отличие от других подлокусов гены DQA1 и DQB1 оказались полиморфными. У гена DQA1 было идентифицировано 8 аллелей, которые были условно разделены на 2 группы: кодирующие остаток аргинина в 52 положении ($Arg\ 52^-$) и не кодирующие его в этом положении ($Arg\ 52^+$). У гена DQB1 идентифицировано 14 аллелей, которые условно могут быть разделены на аллели, содержащие остаток аспарагиновой кислоты в 57 положении ($Asp\ 57^-$) и не содержащие его ($Asp\ 57^+$).

Распределение носительства аллелей генов DQA1 и DQB1 у больных сахарным диабетом и в контрольной группе представлено в табл. 1, 2.

У больных ИЗСД достоверно чаще встречались аллели DQA1*0301 и 0401, DQB1*0201 и 0302 и реже по сравнению с контрольной группой встречались аллели DQA1*0101 и 0201, DQB1*0503, *0602, *0603, *0301.

Полученные результаты позволяют условно обозначить аллели, кодирующие остатки $Arg\ 52^-$ А-цепи и $Asp\ 57^-$ В-цепи, как предрасполагающие (S) к развитию ИЗСД, а аллели, кодирующие $Arg\ 52^+$ и $Asp\ 57^+$, как протекторные (P). Предрасполагающие аллели гена HLA-DQA1 обнаружены у 83% больных, а гена DQB1 – у 87%. Для здоровых эти величины равны соответственно 45 и 47%. Наибольший риск развития диабета имеют носители аллелей DQA1*0301 и DQB1*0302.

Существенно более надежные оценки риска могут быть получены, если в качестве маркеров рассматриваются не отдельные аллели генов HLA-DQA1 и DQB1, а их комбинации.

Таблица 1

Распределение носительства аллелей гена HLA-DQA1 среди больных ИЗСД и здоровых индивидиуов

Аллели гена HLA-DQA1	Остаток Arg в положении 52	Больные ИЗСД, %	Контроль, %	RR	p
DQA1*0101	-	26	66	0,19	<0,001
DQA1*0201	-	7	24	0,25	<0,001
DQA1*0301	+	86	32	12,34	<0,001
DQA1*0401	+	67	50	1,93	<0,002

Таблица 2

Распределение носительства аллелей гена HLA-DQB1 среди больных ИЗСД и здоровых индивидуумов					
Аллели гена HLA-DQA1	Остаток Arg в положении 52	Больные ИЗСД, %	Контроль, %	RR	p
DQB1*0501	-	17	24	-	>0,5
DQB1*0502	-	2	2	-	>0,5
DQB1*0503	+	0	11	0,03	<0,001
DQB1*0601	+	3	3	-	>0,5
DQB1*0602	+	0	14	0,03	<0,001
DQB1*0603	+	0	20	0,02	<0,001
DQB1*0604	-	4	6	-	>0,5
DQB1*0201	-	64	36	3,15	<0,001
DQB1*0301	+	17	36	0,37	<0,005
DQB1*0302	-	71	17	11,40	<0,001
DQB1*0303	+	7	9	-	>0,5
DQB1*04*	+	4	7	-	>0,5

Примечание: RR, p-достоверные различия между группами; здесь и в табл. 2, 3.

В табл. 3 представлена частота распределения всех возможных комбинаций у больных и в контрольной группе.

Таблица 3

Распределение комбинаций предрасполагающих (S) и протекторных (P) аллелей HLA-DQ среди больных ИЗСД и в контрольной группе				
HLA-DQ A/B	Больные ИЗСД, % n=113	Контроль, % n=121	RR	p
SS/SS	52	4	23,12	<,001
SP/SS	23	8	3,21	<,005
SS/SP	16	12	0,1	<,1
SP/SP	7	20	0,02	<,01
PP/SS	1	7		
SS/PP	1	8		
PP/SP	0	17	0,02	<,001
SP/PP	0	16	0,02	<,001
PP/PP	0	8	0,04	<,001

Частота гаплотипа с 4 предрасполагающими аллелями (SS/SS) у больных СД составила 52% против 4% в контрольной группе (RR=23,1, p<0,001). Генотипы, состоящие из трех предрасполагающих и одного протекторного аллеля, можно разделить на две подгруппы. Когда гаплотип S-S представлен у гена DQB1, а S-P – у DQA1, то соответствующие генотипы встречаются у больных достоверно чаще (RR=3,21, p<0,005), чем в случае ситуации S-S от DQA1 и S-P от DQB1. Последние генотипы также представлены чаще среди больных, однако не достигают статистически значимых уровней. Можно предположить, что большое значение в развитии заболевания имеют аллели HLA-DQB1, кодирующие Asp 57. Среди больных снижена частота комбинаций из двух предрасполагающих и двух про-

текторных аллелей и не обнаружено индивидуумов с тремя и четырьмя протекторными аллелями, в то время как в контрольной группе частота таких комбинаций (RR=0,02-0,04, p<0,001) составляла 56% (рис. 1).

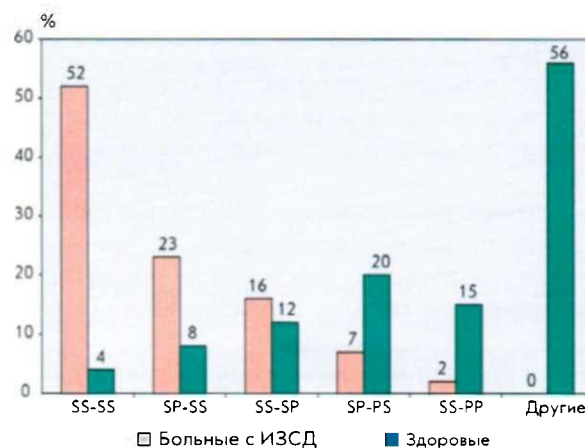


Рис. 1. Частота встречаемости генотипов DQA1/DQB1 в зависимости от количества предрасполагающих (S) и протективных (P) аллелей у больных ИЗСД и здоровых индивидуумов.

Абсолютный риск развития ИЗСД у носителей четырех предрасполагающих аллелей составил 2,54%, что в 13 раз выше популяционного, рассчитанного нами для Москвы. Для носителей трех предрасполагающих аллелей риск составил 0,4%, а для всех остальных индивидуумов – 0,05% и ниже (рис. 2).

На рис. 3 представлена сравнительная характеристика исследованных генетических маркеров по показателю относительного риска развития СД. Наиболее слабым из всех значимых маркеров оказался DQB1*0201, далее по возрастающей следуют DR4, B16, DQB1*0302, DQA1*0301, DR3/DR4, SS/SS.

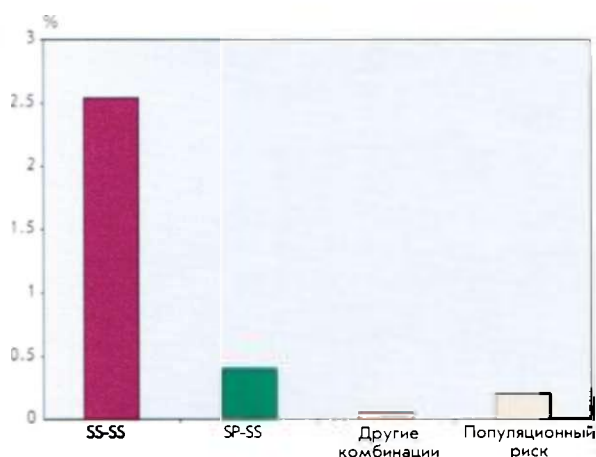


Рис. 2. Абсолютный риск развития ИЗСД в популяции в зависимости от комбинации предрасполагающих (S) и протекторных (P) аллелей в HLA-DQ генотипе.

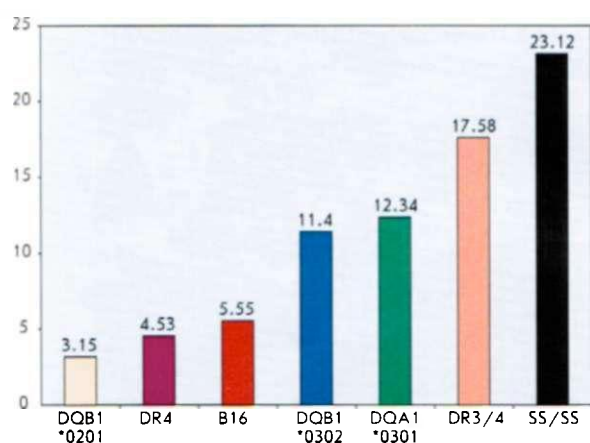


Рис. 3. Относительный риск развития ИЗСД в популяции в зависимости от генетического маркера.

Индивидуальные оценки риска развития ИЗСД у здоровых sibсов могут быть получены при исследовании степени их генетической общности с больным пробандом по генетическим маркерам, ассоциированным с ИЗСД.

Метод определения идентичности по гаплотипам, наследуемым от предков (IBD), позволяет проводить сравнение распределения пар sibсов, идентичных по 2, 1 или 0 маркерным гаплотипам. Для выполнения этих исследований потребовались семьи, сгруппированные в подгруппы в зависимости от числа больных индивидуумов. Первая подгруппа включала 26 семей, в которых имелось два или более sibсов, конкордантных по наличию ИЗСД. Вторая подгруппа – 20 семей, в которых имелись sibсы, дискордантные по ИЗСД с пробандом. В качестве генетической "метки" использовались A, B и DR-антигены системы HLA и аллели A- и B-цепи HLA-DQ. Сравнение полученных данных проводилось с ожидаемым случайным распределением 1:2:1 или 25:50:25. В первой подгруппе это соотношение составило 62,2:26,9:3,9. Отличие от случайного распределения было высоко достоверно ($\chi^2=27,8$, $p<0,001$). Во второй подгруппе соотношение было 21,4:64,3:14,3, что существенно не отличается от случайного распределения 25:50:25 ($p<0,05$).

На основании проведенных исследований получена эмпирическая оценка повторного риска для sibсов в зависимости от идентичности их по гаплотипам. В случае идентичности здорового sibса с больным по двум гаплотипам риск развития заболевания у него составляет 17%, по одному гаплотипу – 3%, у гаплоразличных sibсов – 0,85%. При этом средний риск развития ИЗСД для sibсов без подразделения на гаплотипы принят на основании наших предыдущих исследований и составляет 6,4%.

Суммируя данные, полученные при генетическом типировании больных ИЗСД и при изучении гаплоидентичности sibсов, конкордантных и дискордантных по ИЗСД, можно выделить 3 группы генетического риска развития этого заболевания в семьях больных (табл. 4).

Таблица 4

Степень генетического риска в семьях больных ИЗСД в зависимости от комбинаций предрасполагающих (S) и протекторных (P) аллелей, носительства конкретных аллелей HLA-DQ-генов и гаплоидентичности sibсов

Группа риска	Комбинации S и P аллелей	Носительство конкр. аллелей или HLA-ag	Гаплоидентичность sibсов
Высокий	SS/SS	DQA1*0301, DQB1*0302 DR3,4	По 2 гаплотипам
Средний	SS/SP	DQA1*0401, DQB1*0201 DR4, B16	По 1 гаплотипу
Низкий	SS/PP SP/PP PP/PP	Все остальные аллели DR2	По 0 гаплотипов

С увеличением объема исследований этот риск может быть оценен для родственников больных в цифровом выражении с учетом числа больных и здоровых родственников, возраста консультируемых и возраста манифестации ИЗСД. В дальнейшем могут быть получены суммированные оценки риска, учитывающие все исследуемые показатели.

Исследованные генетические маркеры являются лишь частью генов, определяющих предрасположенность к развитию ИЗСД. Изучение всей совокупности генетических маркеров, определяющих развитие этого заболевания, – задача ближайшего будущего в рамках исследований по Программе “Геном человека”.

Кратко резюмируя полученные данные, следует отметить, что у больных ИЗСД русской популяции Москвы имеет место существенное повышение частоты встречаемости антигенов HLA-B16 и DR4, гаплотипа DR3/DR4, а также аллелей генов HLA-DQA1*0301 и DQB1*0302. Относительный риск при этом составил соответственно 5,55; 4,53; 17,58; 12,34; 3,15. Аллели, кодирующие Arg52(+) в А-цепи и Asp57(+) в В-цепи, встречаются чаще среди больных ИЗСД по сравнению с контрольной группой, что говорит об их предрасполагающей роли в развитии ИЗСД. Аллели, кодирующие Arg52(+) и Asp57(+), встречаются реже при ИЗСД, что позволяет отнести их к про-

текторным. Риск развития ИЗСД зависит от комбинации предрасполагающих и протекторных аллелей в генотипе. Для лиц с наличием 4 предрасполагающих аллелей абсолютный риск составил 2,54%, что примерно в 13 раз превышает популяционный риск развития заболевания. Для лиц, носителей трех предрасполагающих и одного протекторного аллелей, риск составил 0,4%. Для всех остальных комбинаций риск был существенно ниже популяционного. Среди пар сибсов, больных ИЗСД, отмечено достоверное увеличение частоты идентичности по двум HLA-гаплотипам. У сибсов, дискордантных по ИЗСД (один сибс болен, второй здоров), распределение их по степени HLA-идентичности не отличалось от случайного. Риск развития ИЗСД для сибсов, идентичных с больным по двум HLA-гаплотипам, составил 17%, по одному гаплотипу – 3%, полностью различных – 0,85%.

Литература

1. Сергеев А.С. // Генетика. – 1991. – Том 27. – № 11. – С.2021-2034.
2. Bennett S., Todd J. // Diabetes Rev. Intern. – 1996. – Vol. 5. – № 2. – P.2-6
3. Joslin's Diabetes Mellitus // Ed. Kahn C.R., Weir G.C. – Waverly Company: Lea, Febiger, 1994. – 1068 P.