

HLA-маркеры сахарного диабета 1 типа в Тувинской популяции

*И.В. Осокина, М.Н. Болдырева, **Р.К. Ширшина, И.А. Гуськова,
О.В. Богатова, Е.Г. Грудакова, Д.О. Кабдулова, Л.П. Алексеев

Государственный научный центр – Институт иммунологии (дир. – акад. РАМН Р.М. Хаитов) МЗ РФ, Москва,
*Институт медицинских проблем Севера (дир. – проф. В.Т. Манчук) СО РАМН, Красноярск,
**Окружная больница, Кызыл

Сахарный диабет 1 типа (СД 1) – аутоиммунное заболевание, существенная роль в развитии которого принадлежит наследственной предрасположенности. Установление генетических факторов предрасположенности к СД 1 и патогенетически значимых маркеров заболевания имеет большое значение для выявления лиц, входящих в группу повышенного риска развития болезни, для прогноза течения СД 1, а также для выяснения генетически обусловленных механизмов патогенеза заболевания. Последнее десятилетие ознаменовано новым качественным прорывом в изучении генетики СД 1: открыто большое число генов, имеющих значительную ассоциацию с заболеванием [4], однако ведущими по-прежнему являются гены главного комплекса гистосовместимости (HLA) [5].

Важная роль HLA-молекул класса II в обеспечении предрасположенности / устойчивости к СД 1 объясняется функцией этих молекул. Специфический иммунный ответ инициируется, когда T(CD4+)–лимфоцит «узнает» процессированный фрагмент антигена (пептид), связанный с молекулой класса II. Одна из гипотез предполагает, что высокий риск развития заболеваний, ассоциированных с определенными аллелями HLA, объясняется тем, что они представляют аутоантигенные пептиды с высокой аффинностью связывания [6]. Сила сродства между разнообразными молекулами класса II и гипотетическими диабетогенными пептидами может определять результат этого взаимодействия: «отбой» или запуск механизмов «диабетической аутоиммуности».

Предложенный в 1987 г. К. Mullis и F. Faloona [3] метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием термостабильной ДНК-полимеразы и применение его в ДНК-генотипировании аллелей HLA [2] открыл перспективы в повышении эффективности изучения генетической предрасположенности к СД 1, позволил выявлять случаи более высокого относительно риска развития патологии, а также проводить обследование здоровых сибсов для прогноза развития заболевания [1].

Целью настоящего исследования явился анализ ассоциаций генетических маркеров предрасположенности и резистентности к СД 1, локализованных в системе HLA, с помощью ДНК-генотипирования полиморфных аллелей этой системы в тувинской популяции.

Объем и методы исследования

Республика Тува расположена на юге Сибири, на границе с Монголией. Коренное тувинское население (монголоиды) составляет 210 тыс. Среди тувинцев больные СД 1 встречаются с частотой 0.01%, т.е. в 5 раз реже, чем у русских, проживающих в той же географической зоне.

Обследованы 15 тувинцев, больных СД 1. Средняя продолжительность диабета равнялась 7.8 ± 4.3 года. Все пациенты получали инсулинотерапию. Контрольную группу составили 164 произвольно набранных доноров-тувинцев без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним.

HLA-типирование больных СД 1 и здоровых представителей тувинской национальности выполнялось по трем генам: DRB1 (13 специфичностей на уровне «низкого разрешения» – 01,03,04,07,08,09,10,11,12,13,14,15,16; DQA1 (8 аллелей – 0101,0102,0103,0201,0301,0401,0501,0601) и DQB1 (13 аллелей – 0201,0301,0302,0303,0304,0305,04,0501,0502/4,0503,0601,0602-8) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции [1]. Идентификацию продуктов амплификации проводили после электрофореза в 3% агарозном геле и окрашивания продуктов амплификации бромистым этидием.

Частоту аллелей и расчет 3 локусных гаплотипов выполняли при помощи компьютерной программы «Арлекин» (Excoffer, Schneider и Kuffer). Относительный риск (ОР) заболеваемости вычисляли по методу Woolf. Статистическую достоверность отличия ОР от 1 (р) определяли по точному двустороннему критерию Фишера с поправкой Бонферрони на количество исследованных аллелей.

Результаты и их обсуждение

При исследовании DRB1-специфичностей установлено (табл. 1), что наиболее частотным у лиц с СД 1 был DRB1*03 (26.7% у больных СД 1 против 6.1% в контрольной группе, относительный риск, ОР=6.3, $p < 0.05$). Другие различия частот оказались недостоверными.

При исследовании DQA1 аллелей в тувинской популяции (контрольная группа) и в группе больных диабетом наблюдались значительные отличия (табл. 2) в частоте аллелей DQA1*0501 (50% против 24.4%). Для этого аллеля характерен и самый высокий показатель относительного риска (ОР=5.11, $p < 0.05$), т.е. данный ген может рассматриваться как маркер предрасположенности к СД 1 в тувинской популяции. Реже у больных СД 1 по сравнению со здоровыми тувинцами обнаруживали аллели DQA1*0102 и DQA1*0101, эти различия недостоверны.

Таблица 1

Сравнение распределения специфичностей гена DRB1 у больных СД 1 и у здоровых тувинцев

Аллель	Больные СД 1 n = 15	Контроль n = 164	ОР
01	0,0	0,01524	нд
03	0,26667	0,06098	6,3**
04	0,13333	0,15854	нд
07	0,06667	0,08841	нд
08	0,03333	0,05488	нд
09	0,03333	0,05183	нд
10	0,0	0,02744	нд
11	0,03333	0,06707	нд
12	0,10000	0,04878	нд
13	0,20000	0,15549	нд
14	0,06667	0,12500	нд
15	0,06667	0,13720	нд
16	0,0	0,00915	нд

** p<0.05; нд – недостоверно.

Таблица 2

Сравнение распределения специфичностей гена DQA1 у больных СД 1 и у здоровых тувинцев

Аллель	Больные СД 1 n = 15	Контроль n = 164	ОР
0101	0,06667	0,13110	нд
0102	0,06667	0,14939	нд
0103	0,13333	0,12500	нд
0201	0,06667	0,09146	нд
0301	0,16667	0,21646	нд
0401	0,0	0,03659	нд
0501	0,50000	0,24390	5,11**
0601	0,0	0,00610	нд

** p<0.05; нд – недостоверно.

При исследовании распределения DQB1-аллелей (табл. 3) наиболее частотными аллелями у больных СД 1 оказались DQB1*0201 (33.33% у пациентов с СД 1 против 13.72% в контрольной группе) и DQB1*0302 (10% у больных СД 1 против 6.1% у здоровых). Среди вычисленных показателей относительного риска единственно значимое значение отмечено для аллеля DQB1*0201 (ОР=4.22, p<0.5). Это значение ОР свидетельствует о положительной ассоциации данного аллеля с СД 1. Указанный аллель может рассматриваться как маркер предрасположенности к СД 1.

Анализ HLA DRB1-DQA1-DQB1 гаплотипов и генотипов (табл. 4) у больных СД 1 тувинцев и в контрольной группе продемонстрировал, что маркерным гаплотипом для тувинской популяции является 03-0501-0201, ОР развития заболевания при наличии которого составляет 6,3. ОР развития СД 1 при наличии другого «классического» маркерного гаплотипа 04-0301-0302 составил 2,31 (показатель недостоверен в связи с малочисленностью группы больных). Наиболее значимым оказался показатель ОР для генотипа, включающего оба «маркерных» гаплотипа (03-0501-0201, 04-0301-0302), ОР составил 409,8. Такой генотип не был обнаружен ни у одного из 164 здоровых тувинцев.

Таблица 3

Сравнение распределения специфичностей гена DQB1 у больных СД 1 и у здоровых тувинцев

Аллель	Больные СД 1 n = 15	Контроль n = 164	ОР
0201	0,33333	0,13720	4,22*
0301	0,23333	0,25000	нд
0302	0,10000	0,06098	нд
0303	0,06667	0,07622	нд
0401	0,0	0,07012	нд
0501	0,0	0,05183	нд
0502/4	0,06667	0,04268	нд
0503	0,0	0,04268	нд
0601	0,03333	0,04268	нд
0602-8	0,16667	0,22561	нд

** p<0.5; нд – недостоверно.

Таблица 4

Гаплотипы и генотипы генов II класса HLA у больных СД 1 и у здоровых тувинцев

Гаплотипы генотипы	СД 1 n = 15	Контроль n = 164	ОР
DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201	0,26667	0,06098	6,3*
DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302	0,10000	0,05183	2,31 нд
DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201			
DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302	0,10000	0,0	409,8***

** p<0.5; нд – недостоверно.

Выводы

1. Генотипирование аллелей HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 у больных СД 1 и у здоровых доноров в тувинской популяции обнаружило маркеры предрасположенности к сахарному диабету 1 типа.
2. Сравнение частот выявленных аллелей в норме и у больных сахарным диабетом 1 типа показало наличие выраженной положительной ассоциации СД 1 как с отдельными аллелями DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201, так и с гаплотипом DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201.
3. Наиболее выраженная ассоциация обнаружена для «классического» маркерного генотипа DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201/DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302, не встречающегося среди здоровых тувинцев.

Литература

1. Никонова Т.В., Дедов И.И., Алексеев Л.П., Болдырева М.Н., Смирнова О.М., Дубинкин И.В. Сахарный диабет, 2000, №2, с.2-5.
2. Bugavan, T.L., R.K.Saiki, C.H.Levenson, R.M.Watson, and H.A.Erlich.. Bio/Technology.1988, 6:943-947.
3. Mullis, K.B., and F.A.Faloona. Methods Enzymol. 1987, 155:335-350.
4. Owerbach D., Gabbay K.H. Diabetes 1996, 45:544-551.
5. Risch N. Am.J.Hum.Genet. 1987; 40:1-14.
6. Sinha A.A., Lopez M.T., McDevitt H.O. Science 1990; 248:1380-1388.