Клиническая значимость определения HLA-DRB1-генотипов, ассоциированных с предрасположенностью или устойчивостью к сахарному диабету 1 типа, в различных этнических группах России

Л.П. Алексеев[1], И.И. Дедов[2], Р.М. Хаитов[1], М.Н. Болдырева[1], М.В. Шестакова[2], В.А. Петеркова[2], Т.Л. Кураева[2], С.А. Прокофьев[2]

[1]*ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России» (дир. – акад. РАН и РАМН Р.М. Хаитов), Москва*
[2]*ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий (дир. – чл.-кор. РАМН Г.А. Мельниченко), Москва*

Среди генетических маркеров, определяющих предрасположенность или устойчивость к тем или иным заболеваниям, особое место принадлежит генам, входящим в так называемый главный комплекс тканевой совместимости человека (HLA – от human leukocyte antigen).

Это полностью относится к сахарному диабету 1 типа (СД1). Более того, на сегодняшний день ассоциации с HLA наиболее изучены именно для СД1 [1]. Благодаря накоплению знаний о структуре и функции системы HLA, произошла существенная эволюция в уровне выраженности установленных ассоциаций между СД1 и HLA (табл. 1).

Уровень ассоциации отражает значение относительного риска (ОР), позволяющего судить во сколько раз у человека, в генотипе которого представлена та или иная специфичность, выше вероятность развития заболевания (значение ОР>1) или напротив «устойчивость» к его развитию (значение ОР<1).

Хотя наименование системы HLA («главный комплекс генов тканевой совместимости») говорит лишь о взаимосвязи данных генов с реакцией отторжения трансплантата, в действительности функции этой системы гораздо шире. Они включают: 1) обеспечение взаимодействия клеток организма; 2) распознавание собственных, чужеродных и собственных измененных клеток, запуск и реализацию иммунного ответа против них; 3) обеспечение позитивной и негативной селекции Т-клеточных клонов; 4) обеспечение процессинга и презентации иммунодоминантных пептидов – индукторов и мишеней иммунного ответа; 5) генетический контроль иммунного ответа человека; 6) поддержание генетического разнообразия человека как вида, в том числе на пренатальном, интранатальном и постнатальном уровнях.

Нарушение нормального функционирования системы HLA ведет к развитию целого ряда патологий, в частности тех, в основе которых лежит аутоиммунный компонент. Одним из наиболее ярких представителей этой группы заболеваний является СД1 [2, 3].

Функциональное многообразие системы HLA обеспечивается наибольшей ее полиморфностью в геноме человека. Так, в ее состав входит около 2500 аллельных вариантов генов, среди которых встречаются гены, ассоциированные с предрасположенностью или устойчивостью к тем или иным заболеваниям. В ряде случаев гены HLA и их белковые продукты являются не просто маркерами (т. е. свидетелями возможности развития заболевания), а и участвуют в патогенезе заболеваний. В патогенезе аутоиммунных заболеваний, в том числе СД1, антигены

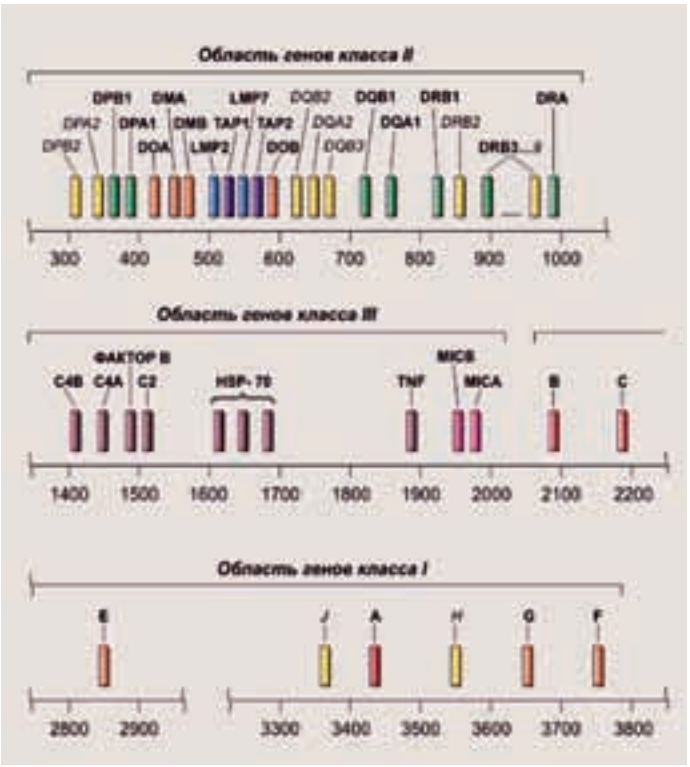


Рис. 1. Схема строения HLA

Таблица 1

Эволюция понятия HLA маркеров СД 1 типа		
Годы	HLA-антигены/ алелли-объекты изучения	RR (антигены, аллели, гаплотипы)
1970–1980	HLA-A, -B	2–4
1980–1989	HLA-DR*	5–8
1989–1996	HLA-DR**/HLA-DQ**	10–15
1996–1998	HLA-DR***+HLA-DQ	20–25
1998–2002	HLA-DR***+HLA-DQ*** + HLA-B; MIC A	45 ...

* Серология.
** ДНК-типирование, низкое разрешение.
*** ДНК-типирование, высокое разрешение.

HLA участвуют всегда. Именно поэтому прогностическая значимость наличия в HLA-генотипе той или иной специфичности, положительно ассоциированной с предрасположенностью к СД1, превышает значение других генетических маркеров и до 80% определяет генетическую предрасположенность к его развитию. В то же время в системе HLA имеются специфичности, определяющие устойчивость к развитию СД1, что особенно важно для клиницистов. При совместном присутствии в гаплотипе как отрицательно и положительно ассоциированной специфичности доминирует эффект отрицательной ассоциации, т. е. проявляется эффект устойчивости к СД1.

Система HLA имеет достаточно сложное строение (рис. 1). Ее гены разделяются на 3 класса, каждый из которых включает значительное количество локусов, обладающих различным уровнем полиморфизма (таб. 2). В каждом локусе у конкретного человека

Таблица 2

Полиморфизм системы HLA		
Классы	Локус	Аллели (n) ДНК-типирование
Класс I	HLA-A	489
	HLA-B	830
	HLA-C	266
	HLA-E	9
	HLA-F	21
	HLA-G	23
Класс II	HLA-DRA	3
	HLA-DRB1	463
	HLA-DRB2-9	82
	HLA-DQA1	34
	HLA-DQB1	78
	HLA-DPA1	23
	HLA-DPB1	125
	DOA	12
	DOB	9
	DMA	4
	DMB	7
	Общее количество	2478

содержится 2 специфичности каждого из аллельных вариантов генов HLA – по одной, наследованной от каждого из родителей. Если эти 2 специфичности различаются между собой, данный человек гетерозиготен по этому локусу. Если они идентичны – гомозиготен.

Основные HLA-маркеры предрасположенности или устойчивости к СД1 расположены в гене DRB1 локуса DR, имеющем 463 аллельных вариантоа, и в гене DQB1 локуса DQ, имеющем 78 аллельных вариантов и 34 варианта гена DQA1. Следует отметить, что именно DRB1 ген по существу является геном иммунного ответа человека [2]. Сами по себе белковые молекулы HLA, кодируемые тем или иным аллельным вариантом HLA-DRB1, имеют минимальные различия аминокислотного состава, которые тем не менее определяют конформационные различия участка молекулы, ответственного за связывание тех или иных иммунодоминантных пептидов. Эти участки молекулы находятся в так называемой бороздке, и HLA-специфичность конкретной молекулы определяет наличие в ней участка связывания конкретного пептида. Результатом такого связывания является развитие иммунного ответа. Этот механизм, по сути, регулирует иммунный ответ [4].

Хорошо известно, что отдельные инфекционные агенты имеют в своей аминокислотной структуре участки, идентичные таковым в некоторых молекулах HLA. В результате иммунный ответ развивается против данной белковой структуры инфекционного агента у лиц, в генотипе которых представлены подобные HLA-специфичности; после первичного «нормального» ответа развивается патологический процесс – аутоиммунитет, направленный против собственных клеток и тканей организма. Таким образом, конкретные молекулы HLA, несущие подобные аминокислотные мотивы, действительно становятся не маркерами, а индукторами развития аутоиммунного процесса. Данный процесс может быть универсальным для всех аутоиммунных заболеваний.

Именно от различия частоты этих, ассоциированных с СД1, HLA-специфичностей в той или иной популяции или расе прямо зависит распространенность

Таблица 3

Частота встречаемости аллельных вариантов гена HLA-DRB1*04 в двух популяционных группах русских		
N	Русские москвичи	Русские поморы
04	11,64	35,37
0401*	3,80	16,21
0402	1,66	0
0403**	0,95	1,47
0404*	3,09	17,69
0405*	0	0
0407	1,66	0
0408	1,19	0
0410	0	0

* Ассоциация с предрасположенностью к СД1.
** Ассоциация с устойчивостью к СД1.

Таблица 4

HLA-специфичности-маркеры СД1	
МАРКЕР	НЕ МАРКЕР
DRB1*01	
	DRB1*02
DRB1*03	
DRB1*04	
	DRB1*05
	DRB1*06
	DRB1*07
DRB1*08	
DRB1*09	
DRB1*10	

(заболеваемость) в ней СД1. Так, чрезвычайно низкая заболеваемость СД1 во всех популяциях ориентов регистрируется на фоне практического отсутствия в них классического маркера СД1 – HLA-DRB1*04. Исключением является популяция узбеков, у которых частота данной специфичности и заболеваемость СД1 приближаются к таковым у европеоидов [5].

Та же закономерность выявлена нами на внутриэтническом уровне (табл. 3). В двух группах российского этноса, а именно у москвичей и поморов (коренных жителей Архангельской области) обнаружены выраженные различия в частоте встречаемости различных аллельных вариантов классического маркера предрасположенности к СД1 – HLA-DRB1*04 [2].

Особенности полиморфизма системы HLA в популяции поморов сходны с таковыми у жителей Финляндии и Норвегии. Также следует отметить, что уровень заболеваемости СД1 среди поморов превышает таковой как среди москвичей, так и в среднем по России и приближается к уровню заболеваемости среди жителей Финляндии, занимающих по этому показателю первое место в мире.

До настоящего времени при исследовании ассоциаций между СД1 (равно как и другими заболеваниями) и HLA объектом являлись отдельные HLA-специфичности, входящие в гаплотип, и внимание, как правило, обращалось лишь на те, для которых уже был установлен высокий уровень ассоциаций. Практически единственными целиком исследуемыми гаплотипами были гаплотип HLA-DR3/DR4 (в гетерозиготе) и гаплотипы HLA-DR4/DR4 и HLA-DR3/DR3 (в гомозиготе). Уровень указанных ассоциаций с СД1 у гетерозигот оказался выше, чем у гомозигот. Развитие представлений о функции HLA (в частности, о механизмах взаимодействия антиген-распознающих участков молекулы HLA с иммунодоминантными пептидами) позволяет трактовать эти данные в пользу независимого участия каждой из молекул HLA, ассоциированных с СД1, в реализации патологического процесса.

Исходя из таких соображений, мы предприняли попытку изучить возможную роль обеих входящих в гаплотипы HLA-специфичностей (положительно и

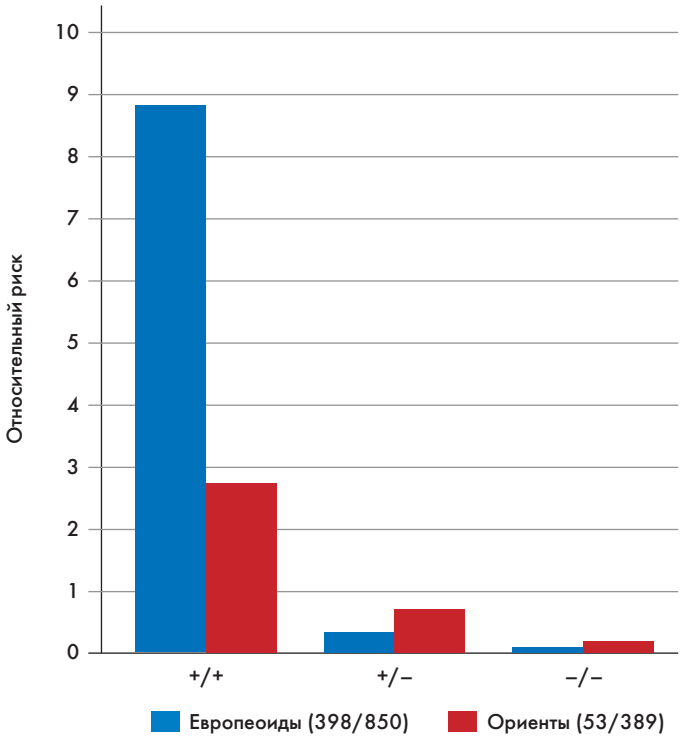


Рис. 2. Эффект наличия в HLA-геноме DRB1-специфичностей, ассоциированных с СД1

отрицательно ассоциированных с СД1). Исследовались роль не только высоко ассоциированных, но и слабо ассоциированных с СД1, а также нейтральных HLA-специфичностей.

Работа проводилась на образцах ДНК европеоидов (русские, татары, удмурты; общее кол-во больных СД1 – 398; контрольную группу составили 850 здоровых представителей данных этнических групп) и ориенты (калмыки, тувинцы, буряты; общее количество больных СД1 – 53; контрольная группа – 389 здоровых представителей данных этнических групп). HLA-генотипирование с определением специфичностей HLA-DRB1 проводили с использованием сиквенс-специфических праймеров. Определяли следующие HLA-DRB1-специфичности: DRB1*01, DRB1*02, DRB1*03, DRB1*04, DRB*05, DRB1*06, DRB1*7, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10 (табл. 4). К положительно ассоциированным с СД1 относили следующие специфичности: DRB1*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10; к нейтральным или отрицательно ассоциированным – DRB1*02, DRB*05, DRB1*06, DRB1*07 [3].

Уровень ассоциаций СД1 и HLA специфичностей оценивали по значению относительного риска (ОР). Все обследованные подразделялись на три группы. Первая (+/+) – лица, в генотипе которых обе специфичности, входящие в HLA-DRB1 генотип, имели положительную ассоциацию с СД1. Вторая (+/–) – лица, в генотипе которых лишь одна DRB1-специфичность была положительно ассоциирована с СД1, а вторая была ней-

тральной или отрицательно (протективно) ассоциированной с СД1. Третья группа (–/–) – лица, в генотипе которых обе DRB1-специфичности были нейтральными или протективно ассоциированными с СД1.

Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют о положительном значении показателя ОР только в первой группе. Кроме того, значения ОР были выше в группах, относящихся к европеоидной расе (ОР=9,2), чем в группе ориентов (ОР=3,2). Как и ожидалось, уровень ОР, свидетельствующий об отсутствии предрасположенности к СД1 (значения менее единицы), был зарегистрирован в группе 3 (значения ОР для европеоидов и ориентов – 0,06 и 0,4 соответственно). Неожиданными, на первый взгляд, оказались данные по группе 2, где значения ОР ниже единицы были установлены как у ориентов, так и у европеоидов – 0,53 и 0,9 соответственно.

Эти данные, на наш взгляд, свидетельствуют в пользу сочетанного участия различных HLA-специфичностей, входящих в генотип и положительно ассоциированных с СД1, в реализации генетической предрасположенности к заболеванию, а по сути дела, и в реализации самого аутоиммунного процесса, лежащего в основе СД1. Иными словами проявляется «эффект необходимости» участия в этом процессе второй специфичности, входящей в HLA-DRB1-генотип, для запуска и развития СД1 [5].

Разумеется, в дальнейшем целесообразно провести подобный анализ и на уровне отдельных аллелей DRB1, для части которых (и в первую очередь входящих в специфичность DRB1*04) уже хорошо установлено наличие как положительных, так и отрицательных ассоциаций с СД1. Целесообразно также проводить аналогичные исследования в отношении аллелей генов HLA-DQA1 и -DQB1, которые, несмотря на выраженную генетическую связь с генами HLA-DRB1, могут вносить самостоятельный вклад в реализацию генетической предрасположенности к СД1. На это, в частности, указывает тот факт, что молекулы HLA, кодируемые генами DQA1 и DQB1, обладают индивидуальными пептид-связывающими сайтами, отличающимися от пептид-связывающих сайтов молекул HLA-DRB1 [4, 7].

Представленные в настоящей работе данные свидетельствует о том, что при разработке подходов к пептидной терапии СД1, как и других аутоиммунных заболеваний, целесообразно создание широкой «библиотеки» искусственных блокирующих пептидов. В этом случае стало бы возможным блокировать участие в развитии СД1 «диабетогенных» эпитопов молекул, составляющих HLA-генотип. Установлено, что специфичность блокировки диабетогенного эпитопа осуществляется на уровне молекулы HLA, кодируемой конкретным аллельным вариантом (например, HLA-DRB1*0401); при этом не может быть блокирован эпитоп молекулы, кодируемой другим аллельным вариантом (например, DRB1*0403). Результатом такой блокировки является исчезновение из крови пациентов антител, имеющих патогенетическое значение – анти-GAD антител и Т-клеток-эффекторов, направленных против β-клеток поджелудочной железы больного [8].

Таким образом, становится очевидной необходимость создания «библиотеки» блокирующих пептидов для всех «диабетогенных» молекул HLA. Такое решение проблемы полностью соответствует направлению, предполагающему разработку индивидуализированных лекарственных средств.

С точки зрения клинической диабетологии и клиники аутоиммунных заболеваний в целом несомненный интерес, на наш взгляд, представляет собой возможность установления индивидуального риска развития заболевания, открывающаяся на основании анализа полного HLA DRB1-генотипа. Сопоставляя присутствие в нем «диабетогенных», нейтральных и протективных HLA-DRB1-специфичностей, можно прийти к заключению о наличии или отсутствии у данного пациента (в том числе из числа членов ядерных семей) повышенной предрасположенности к развитию заболевания. Подобный подход открывает принципиальную возможность установления индивидуального риска развития СД1. Разумеется, дальнейшие исследования в области иммуногенетики СД1 могут резко повысить эффективность этого подхода. Тот уровень (HLA-DRB1-генотипирование), на котором удалось установить такую возможность, уже сегодня позволяет проводить подобного рода оценку не только в специализированных научных центрах, но и в любом практическом учреждении, имеющем обычную ПЦР лабораторию.

Литература

1. Балаболкин М.И., Дедов И.И. // Сахарный диабет. 2000. - №1(6) - С.2-10.
2. Nerup J., Mandrup-Poulsen T., Helqvist S., Andersen H.U., Pociot F., Reimers J.I., Cuartero B.G., Karlsen A.E., Bjerre U., Lorenzen T.// Diabetologia. - 1994.- Vol.37 (Suppl.2). – P.82-89.
3. Yasunaga S, Kimura A, Hamaguchi K, Ronningen KS, Sasazuki T.// Tissue antigens 1996 – Vol. 47 – P. 37-48.
4. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. ВИНИТИ РАН,2005. 375 с.
5. Christen U., Edelmann K., McGavern D., Oldstone M., von Herrath M.//Clinical and Investigative Medicine. 2004.-Vol.27 (4).-P.89.
6. Болдырева М.Н., Гуськова ИА, Богатова ОВ, Янкевич ТЭ, Хромова НА, Тегако ОВ, Атраментова ЛА, Ищук МВ, Дубова НА, Ганичева ЛЛ, Поздеева ОС, Балановская ЕВ, Алексеев ЛП.// Иммунология. 2006. Т.27, Т4, с.98-202.
7. Wucherpfenning KW, Strominger IL.//. J Exp med. – 1995. – Vol. 181 – P. 1597-601.
8. Rajni Rani, Sood A, Goswami R.// Tissue antigens. XIII International Congress on Histocompatibility and Immunogenetics, Seattle 18-22 May, 2002. - P.20.