Взаимосвязь генетических и иммунологических маркеров у родственников больных сахарным диабетом 1 типа

И.И. Дедов, Е.В. Титович, Т.Л. Кураева, Т.М. Атаманова, Я.С. Зверева, С.А. Прокофьев

ФГУ Эндокринологический научный центр Росмедтехнологий (директор – академик РАН и РАМН И.И. Дедов), Москва

Сахарный диабет 1 типа (СД1) является аутоиммунным заболеванием, характеризующимся хроническим дефицитом инсулина, который возникает в результате массивного разрушения β-клеток у генетически предрасположенных индивидуумов. Известно, что на момент постановки диагноза у больных остается всего 10–20% β-клеток, вырабатывающих инсулин [1].

Риск развития СД1 определяется наличием молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с ним, а также количеством специфических аутоантител и степенью ухудшения инсулиновой секреции. Каждый из маркеров в отдельности не имеет высокой прогностической ценности без комбинации с другими. Генетическая предрасположенность к СД1 определяется в первую очередь генами 2 класса области HLA (главный комплекс гистосовместимости) на коротком плече 6-й хромосомы. Подсчитано, что примерно 50% семейных случаев СД1 обусловлено генами HLA (по разным данным вклад генов HLA оценивается в 35–60% из всей совокупности генетических систем, определяющих развитие СД1). Соответственно, на долю иных генов, не относящихся к HLA, приходится вторая половина семейных случаев СД1 [2, 3, 4].

Механизмы, посредством которых гены HLA создают предрасположенность к СД1, либо защиту от него, до настоящего времени не выявлены. Поскольку молекулы, кодируемые генами HLA, представляют иммунной системе процессированные антигены и тем самым запускают иммунную реакцию, возникает предположение о том, что предрасположенность к болезни зависит от способности разных молекул HLA к связыванию и представлению диабетогенных антигенов. Согласно простейшей модели, предрасполагающие молекулы HLA прочно связывают процессированные диабетогенные антигены и тем самым гарантируют их презентацию Т-лимфоцитам, тогда как защитные молекулы связывают и представляют эти антигены менее эффективно. Противоположная гипотеза заключается в том, что предрасполагающие молекулы HLA слабо связывают диабетогенные аутоантигены во внутриутробном периоде развития и неэффективно представляют их клеткам тимуса. Из-за этого не формируется толерантности к антигенам β-клеток. Если допустить, что предрасположенность к СД1 зависит от сродства молекул HLA к известным антигенам β-клеток, можно ожидать, что между этими антигенами и определенными вариантами генов HLA существуют специфические связи. Такие связи до последнего времени не удавалось обнаружить, из чего следовало, что либо ни один из известных антигенов β-клеток не является первичным пусковым фактором в патогенезе СД1, либо предрасположенность к болезни, детерминируемая генами HLA, не зависит от связывающих свойств их продуктов [9, 12]. Однако в исследовании, проведенном в Финляндии, было установлено, что гены HLA тесно связаны с экспрессией разных видов аутоантител как у сибсов больных СД1, так и среди детского населения в целом. То есть определенному гаплотипу HLA может соответствовать определенный вид аутоантител. Например, при обследовании финских школьников обнаружена ассоциация между GADA (аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе) и генотипом DQB1*0201/0302 [5].

Сегодня в оценке риска СД1 используются 4 вида аутоантител, которые являются важнейшими маркерами скрытой аутоиммунной реакции (т.е. доклинических стадий). Некоторые типы аутоантител появляются за 10–15 лет до развития СД. Выявление аутоантител к островковым клеткам, инсулину, глутаматдекарбоксилазе, тирозинфосфатазе, а также их комбинаций позволяет диагностировать латентный диабет, предположить срок манифестации [6, 7, 8].

Таким образом, развитие СД1 обусловлено неблагоприятной комбинацией множества нормальных генов, что и затрудняет задачу определения степени генетического риска. Ранее индивидуальная оценка прогноза развития СД основывалась на выделении предрасполагающих аллелей HLA генов и их комбинаций (с учетом силы маркера). С СД1 ассоциированы аллели гена DQA1, кодирующие остаток аргинина в положении 52 ($Arg52^+$), и аллели гена DQB1, не кодирующие остаток аспарагиновой кислоты в положении 57 ($Asp57^-$). Наибольший риск развития диабета имели носители аллелей DQA1*0301 и DQB1*0302 [2, 9].

В настоящее время используется наиболее прогностически значимый подход – метод определения предрасполагающих и протективных гаплотипов. (Гаплотип – комбинация аллелей, расположенных на одной хромосоме. Их определение проводится на основе семейного материала) [8, 10, 11].

По данным, полученным Зильберман Л.И. и сооавт. [8] в семейных исследованиях, наиболее сильным гаплотипом в русской популяции является DRB1*4-DQA1*0301-DQB1*0302, второе место занимает галотип DRB1*17-DQA1*0501-DQB1*0201, которые встречались в группе больных в 38,7% и 26%, в контроле в 8,3 и 7,1% соответственно. Различия статистически достоверны ($p<0,001$).

По данным международных исследований, наиболее высокий риск развития СД1 в европейских популяциях определяется гетерозиготным генотипом DQA1*0501-DQB1*0201\DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ2/DQ8), DQA1*0301-DQB1*0302/DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8/DQ8). Умеренный риск: DQA1*0501-DQB1*0201/DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2/DQ2), DQA1*0301-DQB1*0302/X (DQ8/X), DQA1*0501-DQB1*0201/X (DQ2/X), где X – другой гаплотип, кроме DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8), DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2). Низкий риск: X/X, где X – протективные гаплотипы. При этом, согласно данным других зарубежных публикаций, комбинации гаплотипов в генотипах различного генетического риска могут варьировать, но генотип высокого риска – DQ2/DQ8 – остается неизменным [5, 11, 12].

Целью нашего исследования являлось изучение ассоциации между предрасполагающими гаплотипами к СД1 (HLA-DQ и DRB1 гены) и появлением аутоантител к антигенам β-клеток у здоровых родственников больных. В настоящее время данный вопрос активно изучается во многих исследованиях.

Материалы исследования

В 131 дискордантных семьях проведено исследование предрасполагающих и протективных гаплотипов (HLA-DRB1, DQ-генов) у здоровых сибсов в комбинации с иммунологическими маркерами (ICA – аутоантитела к цитоплазматическим структурам β-клеток, IAA – аутоантитела к инсулину, GADA – аутоантитела к глутаматдекарбоксилазе).

Обследованные были представлены группой родителей – 242 человека, средний возраст 29,5±0,7 лет, группой пробандов – 131 человек, средний возраст 11,4±0,5 лет, средняя продолжительность заболевания 3,6±0,4 лет (от 1 месяца до 24 лет), группой сибсов – 161 человек, средний возраст 12,09±0,4 лет. Выделены группы различного генетического риска развития СД1. Иммунологическое обследование (определение ICA и/или GADA и/или IAA) проведено у 414 родственников 1 степени родства.

Методы исследования

HLA-типирование

Для HLA-типирования аллелей генов класса 2 (DRB1, DQA1, DQB1) методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции использовались наборы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Определялись следующие специфичности:

DRB1 (14 специфичностей – 01, 03 (17, 18), 04, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16),

DQA1 (8 аллелей – 0101, 0102, 0103, 0201, 0301, 0401, 0501,0601)

DQB1 (13 аллелей – 0201, 0301, 0302, 0303, 0304, 05, 04, 0501, 0502/4, 0503, 0601, 0602/8)

Полимеразная цепная реакция проводилась согласно регламенту, указанному производителем на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология).

Тестирование результатов проводили после электрофореза в 3% агарозном геле и окрашивания продуктов амплификации бромистым этидием.

Определение гаплотипов осуществляли на основе известных таблиц сцепления.

Иммунологическое обследование

Иммунологическое исследование включало определение антител к цитоплазматическим структурам β-клеток (ICA), антител к глутаматдекарбоксилазе (GADA) и антиинсулиновых антител (IAA).

Аутоантитела к цитоплазматическим структурам β-клеток (ICA) в сыворотке крови обследованных определяли с помощью реакции непрямой иммунофлюоресценции с использованием криосрезов поджелудочной железы донора с неотягощенным эндокринологическим анамнезом, группа крови I (0), либо с помощью непрямого иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Biomerica» под торговой маркой «Isletest-ICA» согласно методике производителя. Положительным результат определения антиостровковых аутоантител считался в случае, если титр ICA был больше 1:10 Juvenile Diabetes Foundation (JDF, ед.).

Количественное определение антител к глутаматдекарбоксилазе (GADA) и антиинсулиновых антител (IAA) проводили в сыворотках крови.

Тестирование аутоантител к глутаматдекарбоксилазе (GADA) осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Biomerica» (торговая марка «Isletest-GAD»), аутоантител к инсулину (IAA) с помощью иммуноферментного набора фирмы «Biomerica» (торговая марка «Isletest-IAA»)

Постановка реакции проводилась согласно методике производителя, измерение проводили на фотометре Anthos 2010,

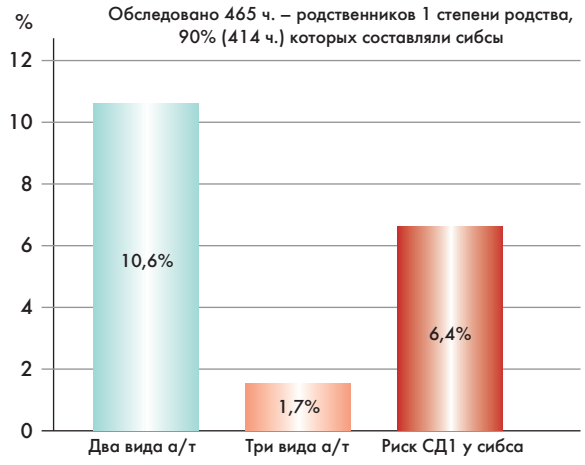


Рис. 1. Иммунологическое обследование у родственников 1 степени родства

и определяли отрицательные (cut-off), сомнительные (серая зона) и количественно – положительные результаты.

Обработку полученных данных проводили общепринятыми методами медицинской статистики с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6,0».

Результаты и их обсуждение

Первичный скрининг, основанный на определении иммунологических показателей, выявил наличие инсулита у 12% обследованных. Значимый титр ICA (> 20 ед.) обнаружен у 16,8% родственников 1 степени родства больных СД 1. Антитела к глутаматдекарбоксилазе были выявлены в 35,2%, IAA в 10,3% случаев.

Так, два вида а/т определялись у 10,6% сибсов, три вида а/т – у 1,7%. При этом риск СД1 у сибсов пробандов, заболевших до 20 лет, составляет 6,4% [2, 9] (рис. 1).

Риск развития СД1, детерминируемого определенными HLA-DQ-генотипами, можно достаточно просто оценить по наличию двух гаплотипов с самими сильными предрасполагающими свойствами: DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2) и DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8) [10, 11, 12]. Гетерозиготность по этим гаплотипам обуславливает наиболее высокий риск. На основании наличия DQ2, DQ8 гаплотипов, были выделены условно различные группы риска (рис. 2):

– группа высокого генетического риска (13%), имеющая генотип DQA1*0501-DQB1*0201\DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ2/DQ8);

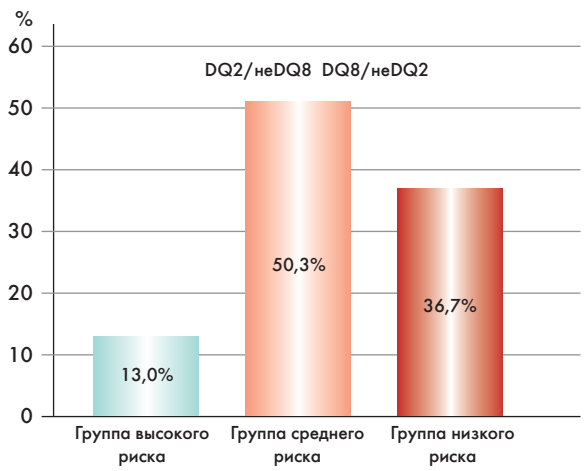


Рис. 2. Группы генетического риска

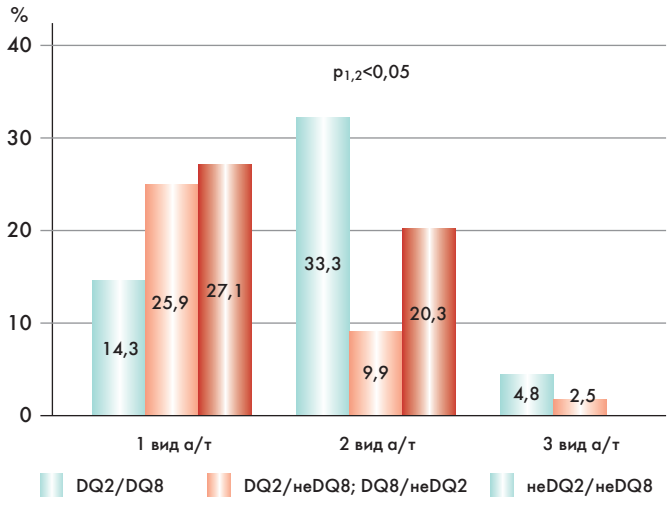


Рис. 3. Частота выявления аутоантител в группах различного генетического риска

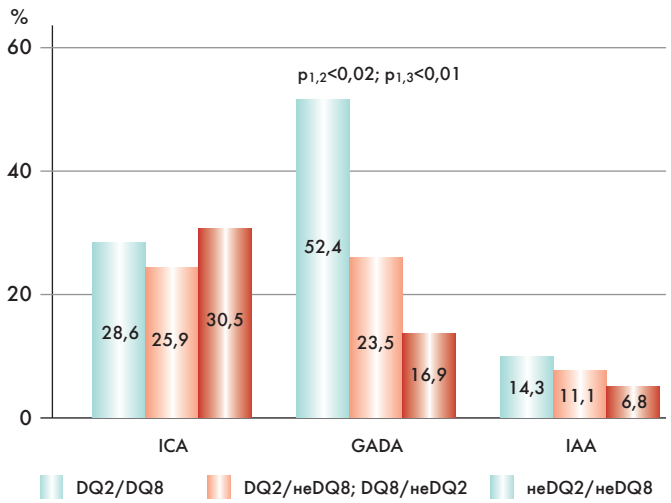


Рис. 4. Частота выявления аутоантител в группах различного генетического риска

– группа среднего риска (50,3%), имеющая эту комбинацию гаплотипов в сочетании с другими: DQA1*0501-DQB1*0201/DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2/DQ2), DQA1*0301-DQB1*0302/DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8/DQ8), DQA1*0301-DQB1*0302/X (DQ8/X), DQA1*0501-DQB1*0201/X (DQ2/X), где X – другой гаплотип, кроме DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8), DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2);

– группа низкого риска (36,7%), не имеющая этих гаплотипов: X/X, где X – все гаплотипы, кроме DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8), DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2).

Наиболее активный аутоиммунный процесс был выявлен в группе высокого риска. Так, в группе высокого риска частота встречаемости 2-х и 3-х видов антител чаще, чем в группе среднего риска (33,3% и 9,9%, p<0,05; 4,8% и 2,5%, соотв., p>0,5), а в группе низкого риска три вида антител вообще не встречались (рис. 3). Согласно исследованиям, проведенным в Финляндии: частота комплексов антител (три и более видов антител) у сибсов с высоким генетическим риском составляла 24,1%, а у сибсов с низким риском – всего 0,9% [5, 12].

При этом, частота встречаемости одного (любого) вида аутоантител значимо не различалась по группам риска – 14,3%, 25,9% и 27,1%, соответственно ($p_{1,2}$=0,2, $p_{1,3}$<0,2). Интересно, что в группе низкого риска отмечалась достаточно высокая частота встречаемости 1-го и 2-х видов аутоантител, что требует дальнейшего их мониторинга.

При анализе зависимости видов антител и степени генетического риска обнаружена ассоциация антител GADA с гаплотипами DQ2/DQ8 и отсутствие такой зависимости для ICA и IAA. Так, GADA достоверно чаще встречались в группе с генотипом DQ2\DQ8 по сравнению с группой среднего и низкого генетического риска (52,4%, 23,5%, 16,9% соотв., $p_{1,2}$<0,02; $p_{1,3}$<0,01) (рис. 4). Достоверных различий по распространенности ICA и IAA в этих группах не получено (28,6% ,25,9% и 30,5%, p>0,5; 14,3%, 11,1% и 6,8, $p_{1,2}$>0,5; $p_{2,3}$; $p_{1,3}$<0,5; соответственно). Как видно из представленных данных, подобная зависимость наблюдалась и для антиинсулиновых аутоантител, однако полученная тенденция не была статистически значимой.

Выявленная ассоциация аутоантител к глутаматдекарбоклсилазе с высоким генетическим риском полностью совпадает с ранее полученными нами данными [9]. Так, GADA достоверно чаще встречались у сибсов больных СД1, входящих в группу высокого генетического риска, по сравнению с группой низкого риска – 28,6% и 7,7% (p<0,05). При этом группа высокого генетического риска была представлена сибсами, имеющими комбинации высоко предрасполагающих аллелей. Более частая встречаемость аутоантител к глутаматдеарбоксилазе в настоящем исследовании обусловлена, вероятно, использованием более сильных генетических маркеров СД1 – гаплотипов. Для ICA и IAA, как и в настоящем исследовании, такой зависимости получено не было [9].

Кроме того, по результатам нашего исследования установлено, что у GADA-положительных сибсов достоверно чаще определялся гаплотип DQ8 по сравнению с GADA отрицательными (51,3% и 29,4%, соотв., p<0,05). Гаплотип DQ2 встречался у них в 35,9% и 29,4% случаев (соотв., p<0,2) (рис. 5).

Представляют интерес данные финских исследований [12]: наибольшая частота IAA у больных СД1 и GADA у здоровых школьников выявлена для носителей гетерозиготного генотипа – DQA1*0501-DQB1*0201\DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ2/DQ8). При этом для больных СД1 были установлены следующие закономерности: носителям гаплотипа DR4-DQB1*0302 свойственны высокая частота встречаемости аутоантител к инсулину и низкая частота – аутоантител к глутаматдекарбоксилазе. Напротив, гаплотип DR3-DQB1*0201 ассоциировал с высокой частотой GADA и низкой – IAA. При обследовании же финских здоровых школьников обна-

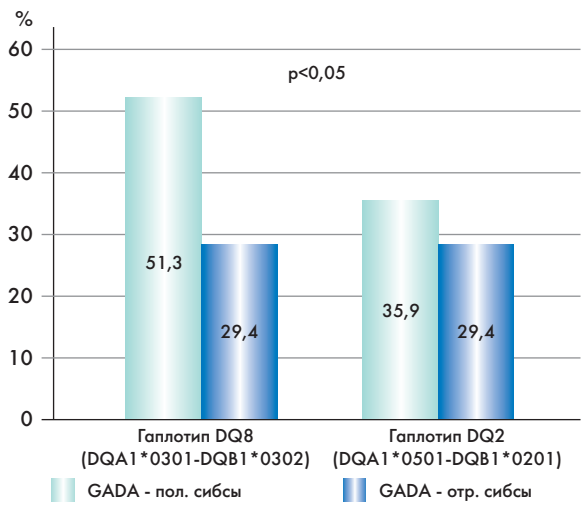


Рис. 5. Ассоциация а/т (GADA) с гаплотипами у родственников 1 степени родства

ружена ассоциация GADA с генотипом DQ2/DQ8 и аллелем DQB1*0302. Аналогичные корреляции GADA, IAA с галотипом DQ8 были получены и другими исследователями [11, 12]. Для ICA не было обнаружено четкой корреляции с данными гаплотипами.

В нашем исследовании отсутствие достоверных различий по распространенности IAA в группах генетического риска, возможно, связано с возрастом обследованных (средний возраст сибсов составил 12,1±0,2). Известно, что аутоантитела к инсулину являются одним из первых кратковременных иммунологических маркеров, появляющихся в доклиническом периоде СД1 у детей раннего возраста [4, 6].

В результате проводимых обследований группа высокого генетического риска составляет 13% от всех обследованных. Все ее представители являются носителями генотипа DQA1*0501-DQB1*0201\DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ2/DQ8), в 50% случаев у них выявляются аутоантитела к островковым клеткам. Интересно, что лишь у 1,9% сибсов (3 чел.) определялась комбинация трех видов а/т, и они являлись носителями гаплотипов DQ2 или DQ2\DQ8. В группах высокого риска проводится мониторинг иммунологических и гормонально-метаболических показателей.

Таким образом, при обследовании сибсов больных СД1 обнаружена четкая ассоциация генотипов высокого и умеренного риска с наличием аутоантител к глутаматдекарбоксилазе и комплексов аутоантител. Полученные данные подтверждают, что гены HLA тесно связаны с экспрессией разных видов аутоантител у родственных больных СД1.

Литература

1. Дедов И.И.,Шестакова М.В.. Сахарный диабет: руководство для врачей, М., Издательство Универсум Паблишинг, 2003.
2. Кураева Т.Л. Генетика сахарного диабета /Сахарный диабет. 2005.
3. Gillespie KM, Gale EAM, Bingley PJ. «High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes». Diabetes 2002;51:210-4.
4. Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, et al. Natural history of β-cell autoimmunity in Young children with increased genetic susptibility to type 1 diabetes recruited from the general population. Clinical Endocrinology Metabolism.2002.87(10):4572–4579.
5. Veijola R., Reijonen H., Vahasalo P., Knip M. et al. HLA-DQB1-defined genetic susceptibility, beta cell autoimmunity, and metabolic characteristics in familial and nonfamilial insulin dependent diabetes mellitus: the Childhoud Diabetes in Finland (DiMe0 Study Group.). J.Clin. Invest. 1996; 98:2489–2495.
6. Knip M. «Prediction and prevention of type 1 diabetes». // Acta P diatr. Supl. 1998. – V.425: P. 54 – 62.
7. Kulmala P., Savola K., Reijonen H., Veijola R. Et al. Genetic marcers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Diabetes. 49:207–210.
8. Mrena S., Savola S., Kulmala P., Knip M. et al. Genetic modification of risk Assesment based on staging of preclinical Type 1 Diabetes in siblings of affected children. Clinical Endocrinology £ Metabolism. 2003; 88 (6):2682–2689.
9. Дедов И.И., Кураева Т.Л.. Петеркова В.А.. Носиков В.В., Сергеев А.С., Титович Е.В., Колесникова Г.С. Генетические факторы в развитии СД1 типа в России. Молекулярная медицина. – 2003 – № 1 (1). С. 31–37.
10. Дедов И.И., Зильберман Л.И., Титович Е.В., Кураева Т.Л., Сергеев А.С., Алексеев Л.П., Болдырева М.А., Прокофьев С.А., Носиков В.В., Петеркова В.А. Предрасполагающие и протекторные к развитию СД1 типа HLA-гаплотипы в русской популяции. Третья Всероссийская научно-практическая конференция. Тезисы докладов. – с. 25, Москва, 2005.
11. Decoches K., Truyen I., Van der Auwera B. Et al. « Combined positive for HLA-DQ2/DQ8 and IA-2 antibodies defines population at high risk of developing type 1 diabetes". Diabetologia. 2005;48:687-694.
12. Kupila A.,Keskenen P., Knip M. et al. Genetic Risk Determines the emergence of Diabetes-Associated Autoantibodies in Yong Children. Diabetes 2002;51:646–51.