

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.379-008.64-055.5/7-07

И. В. Мерсиянова, Ю. А. Князев, М. В. Бурденко, Т. В. Себко, О. В. Евграфов

## АССОЦИАЦИЯ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА И АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА HLA-DQA1

Медико-генетический научный центр (дир. — член-корр. РАМН В. И. Иванов) РАМН, Российский государственный медицинский университет, Москва

Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) является мультифакториальным заболеванием с выраженной генетической предрасположенностью, которая определяется генами II класса главного комплекса гистосовместимости (HLA). В популяциях белой расы была показана сильная ассоциация ИЗСД с HLA DR3 и DR4-антигенами [2]. При этом для гетерозигот DR3/DR4 отмечался значительно более высокий риск развития заболевания, чем для гомозигот DR3/DR3 или DR4/DR4 [5], что свидетельствовало в пользу существования двух генов, ответственных за предрасположенность к диабету и действующих синергично. Это не могли быть собственно гены локуса HLA DR, поскольку продукты генов, определяющих серологические фенотипы DR3 и DR4, не образуют между собой гибридных молекул.

Новое поколение молекулярно-генетических методов, связанных с появлением методики полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволило на уровне ДНК исследовать полиморфизм генов гистосовместимости [7]. Было показано неравновесие по сцеплению между аллелями близко расположенных локусов HLA, в частности DR и DQ [11]. Гены HLA DQ оказались единственным генетическим маркером, для определенных аллелей которого была не только доказана сильная ассоциация с ИЗСД в большинстве изученных популяций, но и обнаружена корреляция между частотой данных аллелей в популяции и заболеваемостью в ней диабетом [6].

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов HLA DQA1 и DQB1 у больных ИЗСД и здоровых индивидуумов [9, 13], а также исследования на животных моделях [1] показали, что с ИЗСД ассоциируют аллели этих генов, кодирующих замену аспарагиновой кислоты в положении 57 DQB-цепи (DQB1 не-Asp57 аллели) и аргинин в положении 52 DQα-цепи (DQA1 Arg52 аллели). Присутствие у индивидуума обоих этих предрасполагающих аллелей приводит к образованию у него “диабетогенных” гетеродимеров (DQα Arg52/DQB не-Asp57), причем у гетерозигот такие гетеродимеры могут формироваться из продуктов DQA1- и DQB1-генов, находящихся в разных (гомологичных) хромосомах [12]. Не исключено, что гомозиготность по наиболее “опасным” с точки зрения развития ИЗСД аллелям может с большей вероятностью приводить к заболеванию или индуцировать заболевание в более ранний период или в более тяжелой форме.

Некоторые из существующих в настоящее время гипотез, касающихся генетической предрасположенности к ИЗСД, не вполне убедительны, и накопленные новые экспериментальные данные в ряде случаев с ними не согласуются. Например, не всегда имеются убедительные свидетельства того, что все Arg52 аллели гена DQA1 в равной степени ответственны за увеличение риска развития диабета. Остается открытым и не до конца ясным вопрос, достаточно ли для предрасположенности к заболеванию присутствия в геноме одного “диабетогенного” аллеля. Появились данные о том, что, возможно, большую роль играют “защитные” аллели, отрицательно ассоциирующие с заболеванием [3, 8]. Для выяснения этих вопросов мы использовали как традиционное сравнение частот аллелей в выборках больных ИЗСД и здоровых доноров, так и некоторые данные семейного анализа.

В настоящей работе ставились следующие основные задачи:

- сравнить частоты аллелей гена HLA DQA1 у больных и здоровых и выявить аллели, положительно и отрицательно ассоциирующие с диабетом;
- проверить, достаточно ли для предрасположенности к ИЗСД наличия одного ассоциирующего с заболеванием аллеля;
- проверить гипотезу о том, что в DQα-цепи за предрасположенность к диабету ответственен Arg52.

## Материалы и методы

Были обследованы и генотипированы 51 больной ИЗСД, а в 31 семье — также родственники больного (54 человека). В контрольную группу вошли 57 здоровых доноров.

Для получения ДНК использовали венозную кровь, которую брали с консервантом следующего состава: 0,48% лимонной кислоты, 1,32% цитрата натрия, 1,47% глюкозы.

ДНК из крови выделяли методом фенол-хлороформной экстракции, предложенным В. Lindblom и G. Holmud [10].

Разделение аллелей гена HLA DQA1 проводили путем амплификации *in vitro* вариабельного 2 экзона этого гена с последующей обработкой амплификата рестриктазами HaeIII, RsaI, FokI и DdeI и дополнительно определяли делецию трех нуклеотидов, присутствующую в аллелях \*0201, \*0401, \*0501, \*0601. Данный метод полимеразной цепной реакции — полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР — ПДРФ) позволяет без применения олигонуклеотидных зондов, процедуры мечения и гибридизации определять 7 различных аллельных состояний гена DQA1 из 8 известных (не разделяя аллели \*0101 и \*0102). Для амплификации использовали следующие праймеры:

5' = GCCTCTACGGTGTAAACITG

5' = ATTGGTAGCAGCGGTAGAGTT.

Таблица 1

Частоты аллелей гена HLA DQA1 у здоровых доноров, у больных ИЗСД и членов их семей

| Аллели DQA1 | Количество хромосом с данным аллелем |      |                   |      |                      |      |
|-------------|--------------------------------------|------|-------------------|------|----------------------|------|
|             | здоровые (n = 114)                   |      | больные (n = 102) |      | члены семей (n = 84) |      |
|             | абс.                                 | %    | абс.              | %    | абс.                 | %    |
| *0101/*0102 | 34                                   | 29,8 | 20                | 19,6 | 24                   | 28,6 |
| *0103       | 9                                    | 7,9  | 2                 | 2,0  | 7                    | 8,3  |
| *0201       | 21                                   | 18,4 | 2                 | 2,0  | 5                    | 6,0  |
| *0301       | 14                                   | 12,3 | 43                | 42,2 | 22                   | 26,2 |
| *0401       | 4                                    | 3,5  | 5                 | 4,9  | 6                    | 7,1  |
| *0501       | 31                                   | 27,2 | 30                | 29,4 | 20                   | 23,8 |
| *0601       | 1                                    | 0,9  | 0                 | 0    | 0                    | 0    |

Для проведения ПЦР применяли программируемый термощиклер РНС-2 фирмы "Techne". ПЦР с использованием термостабильной ДНК-полимеразы Biotag производства СП "Биомастер" проводили в буфере следующего состава: 16,6 мМ сульфат аммония; 67,0 мМ трис-НСI pH 8,8; 1,5 мМ хлорид магния; 0,01% твип-20. Амплификационная смесь содержала по 0,5 мкМ каждого олигопраймера, 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеозидтрифосфата, 2-3 ед. полимеразы Biotag и 0,1-1 мкг геномной ДНК. К смеси добавляли 30-50 мкл вазелинового масла и проводили 28 циклов ПЦР со следующими параметрами: 94°C – 45 с, 50°C – 45 с, 72°C – 60 с.

Результаты ПЦР-ПДРФ оценивали после проведения электрофореза в 8% полиакриламидном геле, с последующим прокрашиванием в растворе бромистого этидия (концентрация 1 мкг/мл); в качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК плазмиды pBR322, рестрицированную HaeIII.

Для статистической оценки достоверности различий по частоте встречаемости отдельных аллелей в двух сравниваемых выборках применяли *t*-критерий Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

По предлагаемой схеме определения аллелей гена HLA DQA1 были генотипированы 57 неродственных человек, не страдающих ИЗСД, 51 больной ИЗСД, а также члены семей 31 больного сахарным диабетом. Полученные частоты аллелей гена DQA1 представлены в табл.1.

У больных ИЗСД повышена частота аллеля DQA1 \*0301 и снижена частота аллеля \*0201 по сравнению с контролем ( $p_c < 0,001$ ), а частоты этих аллелей у родственников больных, как и ожидалось, имеют промежуточные значения. Среди аллелей гена HLA DQA1 аргинин в положении 52 кодируют \*0301, \*0401, \*0501 и \*0601, из них аллель \*0301 кодирует два аргинина подряд – Arg52 и Arg53. Из табл.1 следует, что за предрасположенность к ИЗСД ответствен аллель DQA1 \*0301, наиболее отличающийся от остальных в районе аминокислоты 52. В гене HLA DQB1 из не-Asp57 аллелей наиболее отличается от других в области "ключевой" 57 аминокислоты аллель DQB1 \*0201. Именно для этих аллелей в европейских популяциях наблюдается неравновесие по сцеплению с DR4 (DQA1 \*0301) и DR3 (DQB1\*0201).

С целью проверки гипотезы о критическом значении Arg52 для предрасположенности к диабету нами проведен анализ ассоциации заболевания с Arg52 и не-Arg52 аллелями. Результаты этого анализа представлены в табл.2.

В сравниваемых группах наблюдается различие по частоте аллеля DQA1 \*0301, но не обнару-

Таблица 2

Частоты Arg52 и не-Arg52 аллелей гена HLA DQA1 у здоровых доноров, у больных ИЗСД и членов их семей

| Аллели DQA1     | Количество хромосом с данным аллелем |      |                   |      |                      |      |
|-----------------|--------------------------------------|------|-------------------|------|----------------------|------|
|                 | здоровые (n = 114)                   |      | больные (n = 102) |      | члены семей (n = 84) |      |
|                 | абс.                                 | %    | абс.              | %    | абс.                 | %    |
| Все не-Arg52    | 64                                   | 56,1 | 24                | 23,5 | 36                   | 42,8 |
| *0201           | 21                                   | 18,4 | 2                 | 2,0  | 5                    | 6,0  |
| Другие не-Arg52 | 43                                   | 37,7 | 22                | 21,6 | 31                   | 36,9 |
| Все Arg52       | 50                                   | 43,9 | 78                | 76,5 | 48                   | 57,1 |
| *0301           | 14                                   | 12,3 | 43                | 42,2 | 22                   | 26,2 |
| Другие Arg52    | 36                                   | 31,6 | 35                | 34,3 | 26                   | 31,0 |

Таблица 3

Частоты встречаемости различных аллелей гена HLA DQA1 среди больных ИЗСД и здоровых лиц

| Аллели DQA1 | Количество индивидуумов-носителей |      |                  |      | p*     | RR   |
|-------------|-----------------------------------|------|------------------|------|--------|------|
|             | здоровых (n = 57)                 |      | больных (n = 51) |      |        |      |
|             | абс.                              | %    | абс.             | %    |        |      |
| *0101/*0102 | 27                                | 47,4 | 19               | 37,2 |        |      |
| *0103       | 9                                 | 15,8 | 2                | 3,9  | >0,05  | 0,26 |
| *0201       | 18                                | 31,6 | 2                | 3,9  | <0,001 | 0,11 |
| *0301       | 13                                | 22,8 | 40               | 78,4 | <0,001 | 11,6 |
| *0401       | 4                                 | 7,0  | 4                | 7,8  |        |      |
| *0501       | 29                                | 50,9 | 26               | 51,0 |        |      |
| *0601       | 1                                 | 1,7  | 0                | 0    |        |      |

\*  $p_c$  — с поправкой на число определяемых аллелей гена DQA1.

Таблица 4

Частоты встречаемости Arg52 и не-Arg52 аллелей гена HLA DQA1 среди больных ИЗСД и здоровых лиц

| Аллели DQA1     | Количество индивидуумов-носителей |      |                  |      | p*     | RR    |
|-----------------|-----------------------------------|------|------------------|------|--------|-------|
|                 | здоровых (n = 57)                 |      | больных (n = 51) |      |        |       |
|                 | абс.                              | %    | абс.             | %    |        |       |
| Все не-Arg52    | 54                                | 94,7 | 23               | 45,1 | <0,001 | 0,05  |
| *0201           | 18                                | 31,6 | 2                | 3,9  | <0,001 | 0,11  |
| Другие не-Arg52 | 34                                | 59,6 | 21               | 41,2 | >0,05  | 0,48  |
| Все Arg52       | 39                                | 68,4 | 50               | 98,0 | <0,001 | 15,76 |
| *0301           | 13                                | 22,8 | 40               | 78,4 | <0,001 | 11,61 |
| Другие Arg52    | 32                                | 56,1 | 30               | 58,8 | >0,05  | 1,11  |

живаются различия по частотам других Arg52 аллелей, и, вероятно, отмеченная в ряде работ ассоциация Arg52 аллелей с ИЗСД обусловлена главным образом (или исключительно) ассоциацией заболевания с аллелем DQA1 \*0301.

Если допустить, что для предрасположенности к диабету важно наличие лишь одного "диабетогенного" аллеля, то анализ частоты встречаемости индивидуумов-носителей данного аллеля должен выявить более очевидные закономерности (табл.3).

Аналогичный анализ был проведен и для Arg52 и не-Arg52 аллелей гена HLA DQA1. Результаты приведены в табл.4.

Из 51 больного 40 имели аллель \*0301, из них лишь 3 (7,5%) были гомозиготны по данному ал-

лелю. В контрольной выборке наблюдалось такое же соотношение гомозигот и гетерозигот по аллелю \*0301 (7,7%). Следовательно, можно практически исключить гипотезу о том, что гомозиготы по аллелю \*0301 в большей степени подвержены диабету, чем гетерозиготы. Этот факт представляется интересным в свете имеющихся в настоящее время данных, что для стимулирования Т-клеточного ответа достаточно очень небольшого количества гетеродимеров подходящего типа [4].

## Выводы

1. У больных диабетом наблюдается повышенная частота аллеля HLA DQA1 \*0301 по сравнению со здоровыми людьми и не отмечается увеличения частот других Arg52 аллелей DQA1.

2. Среди пациентов с ИЗСД не наблюдается повышения встречаемости гомозигот по аллелю DQA1 \*0301.

3. Присутствие не-Arg52 аллелей и особенно \*0201 снижает риск возникновения заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Acha-Orbea H., McDevitt H. O. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 84. — P. 2435-2439.
2. Barbosa J., Chern M. M., Reinsmoen N. et al. // Tiss. Antigens. — 1979. — Vol. 14. — P. 426-436.
3. Cavan D. A., Jacobs K. H., Penny M. A. et al. // Diabetologia. — 1993. — Vol. 36. — P. 252-257.
4. Demots S., Grey H. M., Sette A. // Science. — 1990. — Vol. 249. — P. 1028-1030.
5. Deshamps I., Lestrade H., Bonaiti C. et al. // Diabetologia. — 1980. — Vol. 19. — P. 189-193.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.379-008.64-053.3-078.33

И. В. Осокина, Л. Н. Щербачева, Н. Б. Лебедев, В. В. Яздовский, И. И. Дедов

## ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНСУЛИНЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА В МЛАДШЕМ ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Институт иммунологии (дир. — член-корр. РАМН Р. М. Хаитов) Минздравмедпрома РФ, Москва, Институт медицинских проблем

Инсулинзависимый сахарный диабет (ИЗСД) является полиэтиологическим аутоиммунным заболеванием, существенная роль в развитии которого принадлежит генетической предрасположенности. В последние десятилетия наибольшие успехи в исследовании иммуногенетических механизмов развития ИЗСД получены при изучении связи заболевания с антигенами системы HLA (Human Leucocyte Antigen) [1, 2, 8, 15].

Первые маркеры ИЗСД относились к антигенам класса I. Ими являлись HLA B15 и B8 [9]. Впоследствии была установлена более выраженная по сравнению с классом I ассоциация с антигенами DR-локуса: HLA DR3 и DR4. Генетический анализ показал, что первично с предрасположенностью к ИЗСД связаны аллели класса II, в то время как аллели класса I ассоциированы с ним вторично за счет неравновесного сцепления аллелей HLA B8 с DR3 и HLA B15 с DR4. Было установлено также, что наибольший риск

6. Dorman J. S., LaPorte R. E., Stone R. A., Trucco M. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1990. — Vol. 87. — P. 7370-7374.
7. Erlich H. A., Bugawan T. L. // PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification. — New York, 1989. — P. 193-207.
8. Erlich H. A., Zeider A., Chang J. et al. // Nat. Genet. — 1993. — Vol. 3. — P. 358-364.
9. Khalil I., D'Auriol L., Gobet M. et al. // J. clin. Invest. — 1990. — Vol. 85. — P. 1315-1319.
10. Lindblom B., Holmud G. // Gene Anal. Techn. — 1988. — Vol. 5. — P. 97-101.
11. Morel C., Zwahlen F., Jeannot M. et al. // Hum. Immunol. — 1990. — Vol. 29. — P. 64-77.
12. Nepom B. S., Schwartz D., Palmer J. P., Nepom G. T. // Diabetes. — 1987. — Vol. 36. — P. 114-117.
13. Todd J. A., Bell J. I., McDevitt H. O. // Nature. — 1987. — Vol. 329. — P. 559-563.

Получено 01.11.94

I. V. Mersyanova, Yu. A. Knyazev, M. V. Burdenko, T. V. Sebko, O. V. Yevgrafov — ASSOCIATIONS BETWEEN INSULIN-DEPENDENT DIABETES MELLITUS AND HLA-DQA1 ALLELES

**Summary.** The incidence of HLA-DQA1 alleles was assessed in patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), their relatives, and healthy controls using HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR amplified DNA with allele-specific restriction enzymes. A significant increase in the incidence of HLA-DQA1\*0301 allele was observed in diabetics although the ratio of DQA1\*0301 homozygotes to heterozygotes was similar in the patients and controls. The presence of one DQA1\*0301 allele in the genome appeared to be sufficient for susceptibility to IDDM. Comparison of the incidence of other DQA1 "Arg52" alleles in diabetics and healthy controls revealed no differences between the groups. The incidence of DQA1 "non-Arg52" alleles (specifically, DQA1\*0201) was reduced in diabetics as compared to normal controls. The presence of these alleles may be considered as the "protective" factor.

развития ИЗСД имеется у гетерозигот HLA DR3/DR4 по сравнению с гомозиготами [12].

Большой прогресс в изучении генетической предрасположенности к ИЗСД в последние годы связан с использованием методов молекулярной биологии для анализа полиморфизма аллелей II класса HLA. Методами ДНК-типирования показано, что предрасположенность к ИЗСД связана с локусом HLA DQ. Положительно ассоциированные с ИЗСД гаплотипы имеют в позиции 57 HLA DQ β-цепи аланин, валин или серин, в то время как аспарагиновая кислота присутствует в гаплотипах, связанных с невосприимчивостью к болезни [3, 5, 6]. Однако имеются данные, противоречащие гипотезе о том, что аминокислотный состав в позиции 57 HLA DQ β-цепи является безусловным маркером предрасположенности или устойчивости к ИЗСД [10].

У больных ИЗСД обнаружено снижение частоты встречаемости антигена HLA DR2. Этот анти-