

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ DQB1 И DQA1 II КЛАССА СИСТЕМЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ АНТИГЕНОВ В АЗЕРБАЙДЖАНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Гюндуз Ахмед оглы Ахмедов

Азербайджанский медицинский университет, г. Баку, Азербайджан

Поступила 06.04.2017; принята в печать 16.06.2017.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2017-704

Цель. Проведение сравнительного анализа генов DQB1 и DQA1 II класса системы человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) в азербайджанской популяции.

Методы. Нами были изучены аллели гена HLA DQ и субтипы HLA DRB1*04 у 160 детей, больных сахарным диабетом, и 271 здорового ребёнка в азербайджанской популяции. Из 160 больных 50,6% (n=81) составили мальчики, 49,4% (n=79) — девочки. Все больные сахарным диабетом были в возрасте до 18 лет. В качестве группы сравнения был привлечён 271 учащийся медицинского колледжа №1: 79 (29,1%) мальчиков и 192 (70,9%) девочки. Собранные образцы крови были отправлены для дальнейшего исследования в медико-генетическую лабораторию, где проводилось генотипирование образцов при помощи полимеразной цепной реакции.

Результаты. Впервые была изучена взаимосвязь сахарного диабета с генами II класса системы HLA. Установлено, что у азербайджанцев более высокий риск ассоциируется с молекулой HLA DQ2. Молекула HLA DQ8 также создаёт риск, хотя и меньший в сравнении с молекулой HLA DQ2. Необычным оказался тот факт, что для этой популяции аллель HLA DQB1*0304 также был связан с риском сахарного диабета.

Вывод. Связанный с высоким риском сахарного диабета гаплотип DQB1*0302-DQA1*03/DQB1*02-DQA1*05(DQ8/DQ2.5) встречается у 3% представителей азербайджанской популяции, что расценивается как средняя частота сахарного диабета.

Ключевые слова: система человеческих лейкоцитарных антигенов, сахарный диабет, полиморфизм генов, прогноз.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DQB1 II DQA1 CLASS II GENES OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN SYSTEM IN THE POPULATION OF AZERBAIJAN

G.A. Akhmedov

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan

Aim. To perform comparative analysis of DQB1 and DQA1 class II genes of the human leukocyte antigen (HLA) system in the population of Azerbaijan.

Methods. We studied the alleles of HLA DQ gene and subtypes of HLA DRB1*04 in 160 children with diabetes mellitus and in 271 healthy children from the population of Azerbaijan. Out of 160 patients, 50.6% (n=81) were boys, 49.4% (n=79) were girls. All patients with diabetes were under the age of 18 years. As a control group, 271 students of the Medical College No. 1 were involved: 79 (29.1%) boys, 192 (70.9%) girls. The collected blood samples were sent for further investigation to the medical genetic laboratory where polymerase chain reaction-based genotyping of the samples was performed.

Results. For the first time, the relationship of diabetes with class II genes of the HLA system was studied. The Azerbaijani were found to have higher risk associated with HLA DQ2 molecule. The molecule HLA DQ8 also increases risk, although it is lower in comparison with HLA DQ2 molecule. What is unusual is that for this population the allele HLA DQB1*0304 was also associated with the risk of diabetes.

Conclusion. The haplotype DQB1*0302-DQA1*03/DQB1*02-DQA1*05 (DQ8/DQ2.5) associated with high risk of diabetes is found in 3% of the representatives of the population of Azerbaijan, which is estimated as the average prevalence of diabetes.

Keywords: human leukocyte antigen system, diabetes mellitus, gene polymorphism, prognosis.

Изучение связи сахарного диабета с системой человеческих лейкоцитарных антигенов HLA (от англ. Human Leukocyte Antigens) началось ещё с 1970 г. Часть системы HLA, связанную с сахарным диабетом, в литературе называют IDDM1 [1]. Для инсулиннезависимого сахарного диабета связи с системой HLA ранее обнаружено не было, однако в последние годы появились работы, в которых есть указания на то обстоятельство, что данная связь всё-таки присутствует [2].

В развитии заболевания имеют значение и другие факторы. Среди диабетогенных

генов 50% приходится на II класс HLA. В главном комплексе гистосовместимости различают четыре класса. Из них только для II класса доказана тесная связь с инсулинзависимым сахарным диабетом. К таковым относятся гены HLA-DQA1, DQB1 и DRB1.

По отдельности гены HLA-DQ и HLA-DR большого значения не имеют. Риск сахарного диабета повышается в случае комбинации этих генов и передачи по наследству в виде гаплогена. Известно, что совместное присутствие гетерозиготных вариантов DQ8 (DQA1*03-DQB1*0302), DQ2 (DQA1*05-DQB1*02) и HLA-DQ2/DQ8 повышает чувствительность к заболеванию [1].

В разных этнических популяциях встречаются различные вариации генов. У 30% больных встречается гетерозиготный вариант HLA-DQ2/DQ8. HLA-DQA1*0102–DQB1*0602 обладает протективными свойствами. Аллель HLA-DQB также является протективным. Оценивать эти гены по отдельности затруднительно.

Сахарный диабет — полигенное заболевание. Его развитие обусловлено несколькими генами. За исключением локуса IDDM1, связь риска развития сахарного диабета с другими локусами подтверждения не нашла [1]. Для выявления взаимосвязей системы HLA и сахарного диабета создан Международной генетический консорциум инсулиннезависимого сахарного диабета. В данном консорциуме дана подробная информация о связи развития диабета с локусами A, B, C, DRB1, DQ, DP системы HLA, что нашло своё отражение на сайте <http://www.tldb.org> [3].

В исследовании, проведённом в Польше, была изучена частота чувствительных в отношении сахарного диабета генов по годам. Суть работы заключалась в проведении сравнения между диабетогенными генами, встречающимися в современных условиях и 700 лет назад. С этой целью были использованы образцы останков 155 человек, живших в XI–XIV веках.

Было установлено, что в прошлом чувствительных к сахарному диабету генов было немного. Согласно полученным результатам, если генотип HLA DRB в настоящее время встречается у 50,6% больных, то у живущих в прошлые века больных он встречался в 28,4% случаев ($p < 0,001$). Гомозиготная форма аллеля G гена CTLA-49A/G присутствовала у 29,1% живущих в прошлом людей, однако у современных она встречается лишь в 7,6% случаев ($p < 0,001$). В то же время в отношении гена INS-23A/T выраженных различий не наблюдалось. Это подтверждает тот факт, что растущее в последнее время количество больных сахарным диабетом в значительной степени обусловлено не только генетическими факторами, но и воздействием окружающей среды [2].

В русской популяции 80% больных — носители предрасполагающих к сахарному диабету сильных гаплотипов DRB1*:04-DQA1*0301-DQB1*0302 и DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 [4]. Эти гаплотипы имеют краткое обозначение DQ2 и DQ8. Дети русской национальности в возрасте

до 5 лет являются носителями гаплотипов DQ2/DQ8.

Исследования последних 10 лет показали, что в 90% случаев система HLA и антигена приобретают всё большее значение. Больных инсулинзависимым сахарным диабетом, у которых не встречаются гаплотипы HLA, можно отнести к другим типам, однако этиологические механизмы в этих случаях не до конца ясны.

Связь между генами HLA DRB1, DQB1 и сахарным диабетом обнаружена также у иранцев. Для этого были обследованы 105 больных сахарным диабетом и 100 здоровых людей. В результате исследования было установлено, что у мужчин в сравнении с женщинами чаще встречаются аллели DRB1*04:01, DQB1*03:02 и DRB1*04:01-DQB1*03:02. Аллели DRB1*03:01, DRB1*15:01, DQB1*06:01, DQB1*03:01/05:01, DRB1*03:01-DQB1*02:01 и DRB1*15:01-DQB1*06:01 у женщин составляют большинство. У девочек 1–5 лет и мальчиков 6–10 лет чаще встречаются аллели DRB1*04:01 и DQB1*03:02. В то же время у девушек и юношей 20–26 лет преобладали аллели DRB1*15:01 и DRB1*15:01-DQB1*06:01 [5].

В одном из проведённых среди арабов исследований, посвящённых изучению роли системы HLA в развитии инсулинзависимого сахарного диабета, было показано, что риск создают аллели HLA DRB1*03:01 и *04:05 (отношение шансов соответственно 7,76 и 7,52). В то же время аллели DRB1*04:01 и *04:02 также предрасполагают к развитию сахарного диабета. Защитный эффект имеют аллели DRB1*10:01, *13:01, *15:02 и *16:01 [6].

Изучение связи сахарного диабета с системой HLA у детей японской национальности показало, что для аутоиммунного диабета высокий риск создают гомозиготный генотип DRB1-09:01-DQB1-03:03, а также гетерозиготные генотипы DRB1-04:05-DQB1-04:01 и DRB1-08:02-DQB1-03:02. У младших детей высокий риск связан с аллелем DRB1-09:01 [7].

Полиморфизм аллелей HLA DQ и DR был исследован также у представителей китайской национальности. Установлено, что аллели DQA1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201, DQB1*0302 характерны для больных сахарным диабетом, а аллели DQA1*0103, DQA1*0201, DQA1*0401, DQB1*0301, DQB1*0402, DQB1*0501, DQB1*0503, DQB1*0601 и DQB1*0602 носят

Фенотипические частоты аллелей HLA DQB1 и HLA DQA1 у здоровых и больных сахарным диабетом

Аллель	Больные (n=160), %	Контрольная группа (n=271), %	Отношение шансов (доверительный интервал)
HLA DQB1*			
02	116 (72,5)	76 (28,0)	6,8 (4,4–10,5)
0301	14 (8,8)	121 (44,6)	0,12 (0,07–0,22)
0302	86 (53,8)	63 (23,2)	3,8 (2,5–5,8)
0303	2 (1,3)	11 (4,1)	0,30 (0,07–1,37)
0304	12 (7,5)	2 (0,7)	10,9 (2,4–49)
0401	2 (1,3)	1 (0,4)	3,4 (0,31–38,0)
0402	0 (0,0)	11 (4,1)	0,14 (0,02–1,05)
0501	14 (8,8)	38 (14,0)	0,59 (0,31–1,1)
0502	11 (6,9)	30 (11,1)	0,59 (0,29–1,2)
0503	0 (0,0)	19 (7,0)	0,08 (0,01–0,59)
0601	7 (4,4)	40 (14,8)	0,26 (0,12–0,61)
0602	1 (0,6)	31 (11,4)	0,05 (0,01–0,36)
0603	9 (5,6)	26 (9,6)	0,56 (0,26–1,2)
0604	5 (3,1)	20 (7,4)	0,40 (0,15–1,1)
HLA DQA1			
01	43 (26,9)	170 (62,7)	0,22 (0,14–0,33)
02	16 (10,0)	38 (14,0)	0,68 (0,37–1,3)
03	105 (65,6)	97 (35,8)	3,4 (2,3–5,2)
04	0 (0,0)	2 (0,7)	0,56 (0,06–5,42)
05	105 (65,6)	144 (53,1)	1,7 (1,1–2,5)
06	0 (0,0)	2 (0,7)	0,56 (0,06–5,4)

протективный характер ($p < 0,05$). Гаплотипы DR3, DR4, DR9 считаются предрасполагающими к сахарному диабету, а гаплотипы HLA-DR2, DR5 и DR7 — протективными ($p < 0,05$). Помимо этого, у китайцев чувствительными в отношении диабета являются также аллели DRB1*04, DRB1*0301, DRB1*0901, а протективными — аллели DRB1*07, DRB1*08, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14, DRB1*16, DRB1*0406 [8].

Целью нашего исследования было проведение сравнительного анализа генов DQB1 и DQA1 II класса системы HLA в азербайджанской популяции.

Нами были изучены аллели гена HLA DQ и субтипы HLA DRB1*04 у 60 детей, больных сахарным диабетом 1-го типа, и 271 здорового ребёнка в азербайджанской популяции. Из 160 больных 50,6% ($n=81$) составили мальчики, 49,4% ($n=79$) — девочки. Все больные сахарным диабетом были в возрасте до 18 лет. Диагноз сахарного диабета был верифицирован согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения. Средний возраст больных составил 9,1 года.

Дети были разделены на следующие возрастные группы: 0–4 года ($n=18$), 5–9 лет ($n=63$), 10–14 лет ($n=72$), 15–18 лет ($n=7$). Об-

следование проведено на базе детской клинической больницы №6 г. Баку. Для всех пациентов была заполнена специальная карта опроса. В исследование были включены только дети азербайджанской национальности.

В качестве группы сравнения был привлечён 271 учащийся медицинского колледжа №1. Из них 29,1% ($n=79$) составили юноши, 70,9% ($n=192$) — девушки. В контрольную группу не были включены пациенты, имеющие эндокринные заболевания. Помимо этого, обследуемые как в основной группе, так и в контрольной не проживали на одной территории.

Перед проведением необходимых исследований было получено письменное согласие как от самих обследуемых старше 15 лет (здоровых детей и больных), так и от их родителей, а также соответствующее заключение этического комитета.

Взятые для анализа пробы крови хранили при температуре -20°C , а затем обрабатывали при помощи реактива Q&Aamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Собранные образцы крови были отправлены для дальнейшего исследования в медико-генетическую лабораторию университетской больницы Motol при университете Charles, расположенном в Праге (Чехия).

Ассоциация субтипа DRB1*04 с инсулинзависимым сахарным диабетом

Субтип DRB1*04	DQB1*0302-DQA1*03 (имеющие молекулу DQ8), больные дети (n=86), %	DQB1*0302-DQA1*03 (имеющие молекулу DQ8), здоровые дети (n=62), %	Отношение шансов
0401	9 (5,6)	4 (1,5)	1,7 (0,50–5,8)
0402	59 (36,9)	34 (12,5)	1,8 (0,91–3,5)
0403	1 (0,6)	13 (4,8)	0,04 (0,01–0,35)
0404	7 (4,4)	10 (3,7)	0,46 (0,16–1,3)
0405	13 (8,1)	2 (0,7)	5,3 (1,2–25)
0406	0	3 (1,1)	0,17 (0,02–1,6)
0407	1 (0,6)	0	1,5 (0,13–17)
0408	3 (1,9)	0	3,0 (0,33–28)

Данная лаборатория обладает европейским сертификатом для проведения молекулярно-генетических исследований.

Генотипы HLA DQB1, DQA1 и DRB1*04 были определены с помощью метода полимеразной цепной реакции. Для HLA DQA1 изучались аллели 01–06, для HLA DQB1 — аллели 02, 0301, 0303, 0304, 0401, 0402, 0501, 0502, 0503, 0601, 0602, 0603, 0604-9. Для субтипа HLA DRB1*04 определяли аллели DRB1*0401–0408.

Статистическая обработка данных проведена путём определения χ^2 с помощью теста Yates и его коррекции, а также с помощью точного теста Фишера. Для данных показателей были вычислены отношение шансов, доверительный интервал и доверительная вероятность p . Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Частоты аллелей HLA DQB1 и HLA DQA1 у здоровых и больных сахарным диабетом представлены в табл. 1.

Было установлено, что аллели DQB1*02, *0302 и *0304 гена DQB1 являются предрасполагающими к сахарному диабету, а аллели DQB1*0301, *0503, *0601 и *0602 — протективными в отношении его развития. Помимо этого, было выявлено, что для гена DQA1 аллель DQA1*3 ассоциируется с риском сахарного диабета, в то время как аллель DQA1*01 является протективным.

На следующем этапе была изучена связь с риском развития инсулинзависимого сахарного диабета гаплотипов DQB1*02–DQA1*05 (молекула DQ2.5) и DQB1*0302–DQA1*03 (молекула DQ8). Отношение шансов для гаплотипа DQB1*02–DQA1*05 составило 6,64 (95% доверительный интервал 4,28–10,31), для гаплотипа DQB1*0302–DQA1*03 — 3,92 (95% доверительный интервал 2,57–5,397). Для гетерозиготного варианта DQB1*02–DQA1*05/DQB1*0302–

DQA1*03 (DQ2.5/DQ8) отношение шансов было равно 15,38 (95% доверительный интервал 7,06–33,5). Обнаружение молекулы DQ2.5 и DQ8 расценивается как протективное, здесь отношение шансов составило 0,13 (95% доверительный интервал 0,08–0,22).

Сочетание аллеля DQB1*02 с аллелем DQA1*05 (гаплотип DQB1*02–DQA1*05 или молекула DQ2.5) создаёт риск развития сахарного диабета. Молекула DQ2.5 была обнаружена в хромосоме у 74% больных и 17% здоровых обследованных (отношение шансов 6,3, 95% доверительный интервал 4,3–9,2). Однако для гаплотипа DQB1*02–DQA1*02 (молекула DQ2.2) статистически значимых различий между группами выявлено не было (встречался у 9,4% больных и 11% здоровых), отношение шансов было равно 0,84, 95% доверительный интервал составил 0,44–1,6. Для гаплотипа DQB1*02–DQA1*03 (молекула DQ2.3) отношение шансов было равно 2,3, а 95% доверительный интервал 0,79–6,7. Гаплотип DQB1*02–DQA1*03 встречался у больных детей в 5,0%, а у здоровых в 2,2% случаев.

Риск инсулинзависимого сахарного диабета для субтипа DRB1*04 представлен в табл. 2.

Был изучен эффект субтипа DRB1*04 у имеющих молекулу DQ8. Аллель DRB1*0403 обладал протективными свойствами (отношение шансов 0,04, доверительный интервал 0,01–0,35). Несмотря на то обстоятельство, что аллели DRB1*0402 и DRB1*0405 чаще встречались у больных сахарным диабетом, статистически значимой разницы между группами не обнаружено.

Связи данных генов с возрастом также не отмечено. Однако для других генов были получены следующие значения: для DQB1*0302 $p=0,21$, для DQB1*02 $p=0,28$, для гетерозиготного варианта DQB1*02/DQB1*0302 $p=0,28$.

Риск развития инсулинзависимого сахарного диабета в азербайджанской популяции связан в основном с молекулой HLA DQ2, а также с молекулой HLA DQ8. В изучаемой популяции в отдельности необычно высокий риск представляет собой аллель DQB1*0304 (отношение шансов 10,9, 95% доверительный интервал 2,4–49).

В качестве протективных для инсулинзависимого сахарного диабета аллелей были установлены такие аллели, как DQB1*0602, DQB1*0301, DQB1*0503 и DQB1*0601. Аллель DQB1*0603 встречался редко и был расценён как нейтральный. Аллели DQB1*02, DQB1*0302 и DQB1*0304 были определены как связанные с риском сахарного диабета. При анализе гена DQA1 было установлено, что аллель DQA1*01 обладает протективными свойствами, а DQA1*03 связан с риском развития диабета. Аллель DQA1*05 носил нейтральный характер. Для целого ряда европейских популяций с сахарным диабетом тесно ассоциируется гаплотип HLA DQB1*02–DQA1*05 (молекула DQ2.3).

Изучение субтипов DRB1*04 у лиц, имеющих молекулу DQ8, показало, что аллель DRB1*0403 обладает протективными в отношении сахарного диабета свойствами. Сочетание аллеля DRB1*0403 с аллелем DRB1*0406 ещё более усиливает протективный эффект.

Необходимо учесть, что проживание различных национальностей на географически малой территории может быть причиной ошибочных результатов. В процессе исследования мы стремились, чтобы обе группы состояли из представителей одной национальности. Однако, несмотря на это, в исследование случайно могут быть вовлечены люди смешанной национальности. Как у народа, жившего в период Советского Союза, гены азербайджанцев, по всей вероятности, могли смешаться с генами других народов, населяющих страну в тот период. Это в основном касается сбора здоровой группы.

Наличие выраженного социально-экономического роста среди студентов медицинской школы, составляющих здоровую группу, этого не опровергает. Эта группа может иметь представителей, смешанных с русской национальностью. Однако в контрольной группе аллель HLA DQB1*0304 встречался редко. У русских аллель DQB1*0304 в сравнении с азербайджанской популяцией встречается чаще (2,4 и 0,7%

соответственно, www.allelefrequencies.net). В то же время он не ассоциируется с CTLA4. Это ещё раз подтверждает тот факт, что контрольная группа состояла только из азербайджанцев.

Связанный с высоким риском сахарного диабета гаплотип DQB1*0302–DQA1*03/DQB1*02–DQA1*05 (DQ8/DQ2.5) встречается у 3% представителей азербайджанской популяции, что расценивается как средняя частота сахарного диабета.

ВЫВОДЫ

1. Впервые была изучена взаимосвязь сахарного диабета с генами II класса системы HLA. Установлено, что у азербайджанцев более высокий риск ассоциируется с молекулой HLA DQ2.
2. Молекула HLA DQ8 также создаёт риск, хотя и меньший в сравнении с молекулой HLA DQ2.
3. Необычным оказался тот факт, что для этой популяции аллель HLA DQB1*0304 также был связан с риском сахарного диабета.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов по статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eisenbarth G.S. *Immunology of type 1 diabetes*. Second Edition. 2004; 170–197.
2. Witas H.W., Jedrychowska-Dacska K., Zawicki P. Changes in frequency of IDDM-associated HLA DQB, CTLA4 and INS alleles. *Int. J. Immunogenet.* 2010; 37 (3): 155–158. DOI: 10.1111/j.1744-313X.2010.00896.x.
3. Mychaleckyj J.C., Noble J.A., Moonsamy P.V. et al. T1DGC. HLA genotyping in the international type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Clin. Trials.* 2010; 7 (Suppl. 1): 75–87. DOI: 10.1177/1740774510373494.
4. Dedov I.I., Shestakova M.V., Kuraeva T.L. et al. Nosological heterogeneity, molecular genetics and immunology of autoimmune diabetes mellitus. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 2015; (2): 132–138. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1305.
5. Sayad A., Akbari M.T., Pajouhi M. et al. Investigation the role of gender on the HLA-DRB1 and -DQB1 association with type 1 diabetes mellitus in Iranian patients. *Cell J.* 2013; 15 (2): 108–115. Epub. 2013 Jul. 2. PMID: 23862111.
6. Hamzeh A.R., Nair P., Al Ali M.T. The profile of HLA-DRB1 alleles in Arabs with type 1 diabetes; meta-analyses. *HLA.* 2016; 87 (1): 25–30. DOI: 10.1111/tan.12717.
7. Sugihara S., Ogata T., Kawamura T. et al. Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT). HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with type 1A diabetes and their families. *Pediatr. Diabetes.* 2012; 13 (1): 33–44. DOI: 10.1111/j.1399-5448.2011.00833.x.
8. Zhang X.M., Wang H.Y., Luo Y.Y., Ji L.N. HLA-DQ, DR allele polymorphism of type 1 diabetes in the Chinese population: a meta-analysis. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2009; 122 (8): 980–986. PMID: 19493426.