

Оригинальные работы

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ HLA КЛАССА II С БОЛЕЗНЬЮ ГРЕЙВСА В ТУВИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

*И.В. Осокина¹, М.Н. Болдырева², В.Т. Манчук¹, И.А. Гуськова²,
О.В. Богатова², Е.Г. Грудакова², Д.О. Кабдулова², Л.П. Алексеев²*

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск

² Институт иммунологии МЗ РФ, г. Москва

Цель: изучить ассоциации генов HLA – DRB1, DQA1 и DQB1 – с болезнью Грейвса (БГ) в тувинской популяции.

Материал и методы. Проведено HLA-генотипирование 40 больных с БГ и 164 здоровых тувинцев. Генотипирование выполнялось по трем генам HLA: DRB1 (13 аллелей); DQA1 (8 аллелей) и DQB1 (12 аллелей) – методом мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Для типирования использовали наборы фирмы «ДНК-Технология» (Россия).

Результаты. Выраженность ассоциации HLA-аллелей с развитием БГ в тувинской популяции определялась по значению относительного риска (ОР). Наибольшая положительная ассоциация обнаружена для аллелей HLA DQA1*0501 (ОР = 1,76; $p < 0,05$); DQB1*0301 (ОР = 1,44; $p < 0,05$) и гаплотипа DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301 (ОР = 3,53). Отрицательно ассоциированы DRB1*0302 (ОР = 0,19) и гаплотип DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 (ОР = 0,02).

Выводы. Установлены HLA-маркеры предрасположенности к БГ в тувинской популяции: DQA1*0501; DQB1*0301 и гаплотип DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301.

Ключевые слова: гены HLA-DRB1, DQA1, DQB1, болезнь Грейвса, тувинская популяция.

Association of polymorphous alleles of class II HLA genes with Graves' disease (GD) in Tuvinian population

*I.V. Osokina¹, M.N. Boldyreva², V.T. Manchouk¹, I.A. Guskova²,
O.V. Bogatova², E.G. Grudakova², D.O. Kabdulova², L.P. Alexeev²*

¹ Institute for Medical Studies of the North, Krasnoyarsk

² Institute of Immunology, Moscow

Aim: to consider association of polymorphous alleles of class II HLA genes with Graves' disease (GD) in Tuvinian population.

Methods. HLA-genotyping was accomplished in 40 GD patients and 164 volunteers randomly selected in Tuvinian population (native Siberian population, Mongoloids). GD was diagnosed according to the clinical and laboratory criteria. HLA-genotyping for 14 DRB1 alleles, 8 DQA1 alleles and 13 DQB1 alleles was performed by polymerase chain reaction sequence-specific primers (DNA-Technology, Russia). Statistical analysis was performed using the Excoffer, Schneider and Kuffer package. RR have been calculated using Woolf method.

Results. We found the HLA-markers of predisposition to GD in Tuvinians: HLA DQA1*0501 (RR = 1.76; $p < 0.05$) and DQB1*0301 (RR = 1.44; $p < 0.05$). Analysis of the HLA haplotypes showed, that DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301 was associated with an increased risk of GD (RR = 3.53). The protective were DRB1*0302 (RR = 0.19) and haplotype DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 (RR = 0.02).

Conclusions. This molecular genetic study has been shown that HLA DQA1*0501, DQB1*0301 and haplotype DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301 associated with Graves' disease in Tuvinian population.

Key words: Graves' disease, HLA-DRB1, DQA1, DQB1 genes, Tuvinian population.

Введение

Болезнь Грейвса (БГ, диффузный токсический зоб) — аутоиммунное заболевание, характеризующееся стойкой патологической гиперсекрецией тиреоидных гормонов. В основе патогенеза БГ лежит выработка стимулирующих аутоантител к рецепторам тиреотропного гормона (ТТГ). БГ нередко сочетается с другими аутоиммунными заболеваниями, включая болезнь Аддисона, сахарный диабет I типа, хронический гепатит, целиакию, рассеянный склероз, миастению Гравис, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру, пернициозную анемию, ревматоидный артрит, системную склеродермию, витилиго, алопецию [1, 2, 3]. Увеличение заболеваемости БГ в семьях и у монозиготных близнецов свидетельствует о выраженном влиянии генетических факторов: на 79% риск развития БГ связан с генетическими эффектами [2–3].

Многочисленными исследованиями установлено, что БГ является многофакторным, полигенным заболеванием. Важная роль в его возникновении отводится наследованию определенных HLA-генов и других генов, связанных с иммунным ответом. На 20% риск развития БГ ассоциирован с генами HLA класса II; на 30% — с геном CTLA-4; на 20–30% — с генами CD 40 и RTPN22 [4–7].

Установлено, что лица, которые имеют HLA DR3 антиген или гаплотип DRB1*0304 — DQB1*02 — DQA1*0501, предрасположены к развитию БГ. Взаимосвязь между наследованием HLA-генов и БГ такова, что показатель относительного риска может составлять от 2 до 5. Этого недостаточно, чтобы объяснить увеличение риска БГ, наблюдаемое во многих семьях [3].

О связи между генами HLA и БГ свидетельствуют результаты популяционных исследований. У кавказоидов с развитием БГ ассоциированы гены HLA DRB1*0301, DRB3*0101 и DQA1*0501, гаплотипы HLA-DRB1*0304-DQB1*02-DQA1*0501 и DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 (или B8/DR3). Протективными генами у европеоидов являются HLA DQB1*0602 и DRB1*0701, а также гаплотип DRB1*0701-DQA1*0201 [2–7].

HLA-маркеры БГ, выявленные у кавказоидов, не характерны для афроамериканцев. У них предрасположенность к БГ связана с HLA-гаплотипом DRB3*0202-DQA1*0501 [5].

Другие HLA-ассоциации с БГ найдены для монголоидных популяций. У китайцев и японцев отмечается отсутствие связи БГ с DQA1*050. Маркерами предрасположенности к БГ в китайской популяции являются DRB1*1602, *0301, *1405, DRB5*02, DQB1*0502, DQB1*0303. Отрицательно ассоциированные с БГ гены у китайцев (HLA DRB1*0301,

DRB1*1501, DQB1*0301) также отличаются от протективных генов у европеоидов. Маркерами резистентности к развитию БГ в японской популяции являются DQA1*0102 и DQB1*0602 [6, 7].

Настоящая работа посвящена изучению ассоциации полиморфных аллелей генов HLA класса II с БГ в тувинской популяции.

Материал и методы

По данным медицинской статистики, в Республике Тыва отмечается высокая заболеваемость БГ — 112,6 на 100 тыс. взрослого населения [8–10].

Проведено HLA-генотипирование 40 больных с БГ и 164 здоровых представителей тувинской национальности без аутоиммунных заболеваний и отягощенной по ним наследственности.

В группе больных БГ было 35 женщин и 5 мужчин в возрасте от 16 до 56 лет. Средний возраст обследованных составил 34 ± 11 лет. Диагноз БГ был установлен на основании анамнеза, клинических данных, результатов функционального, лабораторного и гормонального обследования. Аутоиммунные заболевания (сахарный диабет I типа, пернициозная анемия, алопеция, витилиго, атопический дерматит, бронхиальная астма) отмечались у 11 (27,5%) больных БГ.

HLA-типирование 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.

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

Частоту аллелей и расчет трех локусных гаплотипов выполняли при помощи компьютерной программы “Арлекин” (Excoffer, Schneider and Kuffer). Относительный риск (ОР) заболеваемости вычисляли по методу Woolf. Статистическую достоверность отличия ОР от 1 (p) определяли по точному двустороннему критерию Фишера с поправкой Бонферрони на количество исследованных аллелей [8–11].

Результаты и обсуждение

1. Исследование HLA-аллелей DRB1, DQA1, DQB1. В результате HLA-генотипирования были установлены HLA-генотипы для всех обследованных. Проведен расчет частот выявленных HLA-аллелей и генотипов у больных БГ и в здоровом контроле. В тувинской популяции встречались не все исследо-

Таблица 1. Анализ ассоциации аллелей HLA-DRB1 с развитием болезни Грейвса в тувинской популяции

| HLA | Больные, % | Контроль, % | ОР | <i>p</i> |
|---------|------------|-------------|------|----------|
| DRB1*01 | 2 (2,5) | 3 (1,52) | 1,66 | 0,29 |
| DRB1*04 | 9 (11,3) | 26 (15,9) | 0,69 | 0,09 |
| DRB1*07 | 5 (6,3) | 14 (8,8) | 0,64 | 0,13 |
| DRB1*08 | 5 (6,3) | 9 (5,5) | 1,15 | 0,20 |
| DRB1*09 | 5 (6,3) | 8 (5,2) | 1,22 | 0,20 |
| DRB1*11 | 8 (10,0) | 11 (6,7) | 1,55 | 0,11 |
| DRB1*13 | 18 (22,5) | 25 (15,5) | 0,50 | 0,19 |
| DRB1*14 | 9 (11,3) | 20 (12,5) | 0,89 | 0,15 |
| DRB1*15 | 9 (11,3) | 23 (13,7) | 0,80 | 0,13 |
| DRB1*17 | 8 (10,0) | 11 (6,1) | 1,71 | 0,09 |

Примечание. ОР – относительный риск.

Таблица 2. Анализ ассоциации аллелей HLA-DQA1 с развитием болезни Грейвса в тувинской популяции

| HLA | Больные, % | Контроль, % | ОР | <i>p</i> |
|------------|------------|-------------|------|----------|
| DQA1*0101 | 7 (8,8) | 22 (13,1) | 0,64 | 0,09 |
| DQA1*0102 | 14 (17,5) | 24 (14,9) | 1,21 | 0,11 |
| DQA1*0103 | 7 (8,8) | 20 (12,5) | 0,67 | 0,11 |
| DQA1*0201 | 5 (6,3) | 15 (9,1) | 0,66 | 0,14 |
| DQA1*0301 | 14 (17,5) | 35 (21,63) | 0,77 | 0,09 |
| DQA1*0501* | 29 (36,3) | 41 (24,3) | 1,76 | 0,01 |

Примечание. ОР – относительный риск.

Таблица 3. Анализ ассоциации аллелей HLA-DQB1 с развитием болезни Грейвса в тувинской популяции

| HLA | Больные, % | Контроль, % | ОР | <i>p</i> |
|-------------|------------|-------------|------|----------|
| DQB1*0201 | 12 (15,0) | 22 (13,7) | 1,11 | 0,13 |
| DQB1*0301* | 26 (32,5) | 41 (25,0) | 1,44 | 0,04 |
| DQB1*0303 | 6 (7,5) | 12 (7,6) | 0,98 | 0,19 |
| DQB1*0302 | 1 (1,3) | 20 (6,1) | 0,19 | 0,05 |
| DQB1*0401 | 7 (8,8) | 11 (7,0) | 1,27 | 0,16 |
| DQB1*0501 | 3 (3,8) | 9 (5,2) | 0,71 | 0,22 |
| DQB1*0503 | 4 (5,0) | 7 (4,3) | 1,18 | 0,22 |
| DQB1*0601 | 2 (2,5) | 7 (4,3) | 0,58 | 0,23 |
| DQB1*0602-8 | 18 (22,5) | 37 (22,6) | 1,00 | 0,12 |

Примечание. ОР – относительный риск.

ванные HLA-аллели: не выявлены DRB1*10, DRB1*12, DRB1*16; DQA1*0601; DQA1*0401; DQB1*0304; DQB1*0305.

При сравнении частот HLA-генов у больных БГ установлено достоверное повышение частот аллелей DQA1*0501 (36,3% против 24,3%, $p < 0,05$) и DQB1*0301 (32,5% против 25%; $p < 0,05$). С меньшей частотой в группе больных встречался HLA-аллель DRB1*0302 (1,3% против 6,1%, $p = 0,05$).

Выраженность ассоциации HLA-аллелей с развитием БГ в тувинской популяции определялась по значению относительного риска (ОР), величина которого показывает, во сколько раз больше риск развития болезни при наличии конкретного гена, чем при его отсутствии. Установлены положительные

(ОР > 1) и отрицательные (ОР < 1) ассоциации генов HLA с развитием заболевания. Положительно ассоциированы с развитием БГ у тувинцев HLA-аллели DQA1*0501 (ОР = 1,76; $p < 0,05$) и DQB1*0301 (ОР = 1,44; $p < 0,05$). Отрицательно ассоциирован HLA-DRB1*0302 (ОР = 0,19).

При анализе аллелей HLA-DRB1 установлена положительная связь с HLA-DRB1*17 (ОР = 1,71), однако различия частот у больных БГ и здоровых тувинцев оказались недостоверны (табл. 1).

Выявлены достоверные отличия в частоте DQA1*0501 в контрольной группе и в группе больных БГ (ОР = 1,76; $p < 0,05$), т.е. данный ген может рассматриваться как маркер предрасположенности к болезни Грейвса в тувинской популяции (табл. 2).

Таблица 4. Маркерные гаплотипы и генотипы болезни Грейвса в тувинской популяции

| DRB1-DQA1-DQB1 гаплотипы | БГ, % | Контроль, % | ОР | <i>p</i> |
|--------------------------|----------|-------------|------|----------|
| 13-0501-0301 | 8 (10,0) | 10 (3,0) | 3,53 | 0,01 |
| 04-0301-0302 | 0,0 | 17 (5,2) | 0,02 | 0,04 |

Примечание. ОР – относительный риск.

При изучении распределения DQB1-аллелей наиболее ассоциированным с БГ оказался DQB1*0301 (32,5% при БГ против 25,0% в контроле, ОР = 1,44; $p < 0,05$). Этот аллель является маркером предрасположенности к БГ в тувинской популяции (табл. 3).

2. Исследование HLA гаплотипов и генотипов. Проведенный анализ HLA DRB1-DQA1-DQB1 гаплотипов и генотипов у больных БГ и здоровых тувинцев показал, что маркерным гаплотипом является DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301 (ОР = 3,53). Отрицательная ассоциация установлена для гаплотипа DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302 (ОР = 0,02) (табл. 4).

Вывод

В результате генотипирования аллелей HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 установлены маркеры предрасположенности к болезни Грейвса в тувинской популяции: DQA1*0501; DQB1*0301, а также гаплотип DRB1*13-DQA1*0501-DQB1*0301.

Список литературы

1. Jenkins R.C., Weetman A.P. Disease associations with autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2002; 11: 977–988.
2. Hansen P.S., Brix T.H., Iachine I., Kyvik K.O., Hegedus L. The relative importance of genetic and environmental effects for the early stages of thyroid autoimmunity: a study of healthy Danish twins. *Eur. J. Endocrinol.* 2006; 154: 29–38.
3. Chen Q.-Y., Huang W., She J.-X., Baxter F., Volpe R., MacLaren N.K. HLA-DRB1*08, DRB1*03/DRB3*0101, and DRB3*0202 are susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1*07 is protective. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 3182–3186.
4. Sawai Y., Sawai Y., DeGroot L.J. Binding of human thyrotropin receptor peptides to a Graves' disease predisposing human leukocyte antigen Class II molecule. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000; 85: 1176–1179.
5. Inaba H., Martin W., Ardito M., De Groot A.S., De Groot L.J. The role of glutamic or aspartic acid in position four of the epitope binding motif and thyrotropin receptor-extracellular domain epitope selection in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95: 2909–2916.
6. Yanagawa T., Taniyama M., Enomoto S., Gomi K., Maruyama H., Ban Y., Saruta T. CTLA4 gene polymorphism confers susceptibility to Graves' disease in Japanese. *Thyroid*. 1997; 7: 843.
7. Wong G.W., Cheng S.H., Dorman J.S. et al. The HLA-DQ associations with Graves' disease in Chinese children. *J. Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 1999; 50 (4): 493–495.
8. Осокина И.В. Эпидемиологические и иммуногенетические особенности йоддефицитных заболеваний и сахарного диабета у коренного и пришлого населения Средней Сибири: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. М., 2002. 39 с.
9. Осокина И.В., Манчук В.Т. Йоддефицитные заболевания в Центральной Сибири. Новосибирск: Наука, 2012. 153 с.
10. Осокина И.В., Болдырева М.Н., Алексеев Л.П. HLA-маркеры инсулинзависимого сахарного диабета в тувинской популяции. *Сахарный диабет*. 2001; 4: 8–9.
11. Осокина И.В. Иммуногенетические аспекты сахарного диабета 1 типа. Новосибирск: Наука, 2012. 110 с.