

Т.В. Пухликова¹, Л.Л. Лебедева¹, Т.Н. Потапова¹, Е.А. Рославцева², Е.А. Сабельникова³,
Т.А. Астрелина¹, М.В. Яковлева¹

¹ Банк стволовых клеток, Москва

² Научный центр здоровья детей РАМН, Москва

³ ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва

Значение генетических факторов в развитии целиакии

Контактная информация:

Пухликова Татьяна Владимировна, биолог лаборатории HLA-типирования Банка стволовых клеток

Адрес: 115541, Москва, ул. Бакинская, д. 31, тел.: (495) 327-18-53, e-mail: ptv-mos@mail.ru

Статья поступила: 11.05.2010 г., принята к печати: 16.08.2010 г.

В исследовании изучалась генетическая предрасположенность к развитию целиакии. Проанализированы образцы периферической крови 28 детей и 17 взрослых пациентов с диагнозом глютеночувствительной целиакии, а также образцы пуповинной крови 2062 здоровых новорожденных. HLA-типирование проводилось с помощью полимеразной цепной реакции. Выявлена высокая частота встречаемости групп аллелей DQB1*02 и DQB1*03 у пациентов с целиакией. В частности, аллельные варианты DQB1*03, которые не экспрессируют молекулу DQ8, выявлены у 16 (57%) детей с целиакией. Кроме того, у больных целиакией выявлены различные варианты HLA-гаплотипов, определяющих предрасположенность к заболеванию. Таким образом, результаты работы свидетельствуют о возможности прогнозирования индивидуального риска развития целиакии у здорового населения и родственников больных.

Ключевые слова: дети, глютеночувствительная целиакия, HLA-типирование, генетическая предрасположенность, диагностика.

Глютеночувствительная целиакия (ГЦ) — мультифакторальное заболевание, в патогенезе которого ключевую роль играет генетическая предрасположенность. Частота заболевания целиакией в Европе составляет: 1:267 — в Швеции, 1:300 — в Западной Ирландии, 1:500 — в Дании, 1:2700 — в Эстонии [1]. Частота встречаемости целиакии в России ранее не изуча-

лась, предполагаемая частота составляет примерно 1:100–250 [1].

В настоящее время достигнуты значительные успехи в установлении причин и механизмов развития целиакии, поэтому возрос интерес к разработке и использованию скрининговых программ для ранней ее диагностики и выявления групп риска среди род-

T.V. Pukhlikova¹, L.L. Lebedeva¹, T.N. Potapova¹, Ye.A. Roslavl'tseva², Ye.A. Sabel'nikova³, T.A. Astrelina¹,
M.V. Yakovleva¹

¹ Bank of stem cells, Moscow

² Scientific Center of Children's Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

³ Central Scientific Institute of Gastroenterology, Moscow

Genetic factors in development of celiac disease

The article describes results of a study of genetic predisposition to celiac disease. Samples of peripheral blood of 28 children and 17 adults with celiac disease sensitive to gluten, and samples of funic blood of 2062 healthy newborns were analyzed. HLA-typing was performed with polymerase chain reaction. High frequency of groups of DQB1*02 and DQB1*03 in patients with celiac disease was detected. Particularly, allele types DQB1*03, which does not express molecule DQ8, are revealed in 16 (57%) children with celiac disease. Besides, patients with celiac disease had different types of HLA-haplotypes, predisposing the disease. Thus, results of a work show an opportunity of prognosis of individual risk of celiac disease development in healthy people and relatives of patients.

Key words: children, celiac disease sensitive to gluten, HLA-typing, genetic predisposition, diagnostics.

ственников пациентов с подтвержденным диагнозом. Механизм наследования ГЦ относится к аутосомно-доминантному типу с неполной пенетрантностью [2, 3]. Доказана ассоциация заболевания с антигенами главного комплекса гистосовместимости человека HLA-DQ2 (DQA1*0501, DQB1*0201) и HLA-DQ8 (DQA1*0301, DQB1*0302) [1–3]. Указанные гликопротеиды расположены на поверхности макрофагов, Т и В лимфоцитов и выполняют рецепторные функции. Есть основания предполагать, что именно они ответственны за распознавание «токсичных» фракций глиаина и последующего запуска комплекса иммуннопатологических процессов [3–13]. Гетеродимер DQ2 обнаруживается приблизительно у 90–95% больных целиакией [3, 7]. Он сформирован β-цепочкой, кодируемой аллелями DQB1*0201 или DQB1*0202, и α-цепочкой, кодируемой аллелями DQA1*05. Однако аллель HLA-DQ2 является распространенной в популяции, она определяется приблизительно у 30% европейцев без всяких признаков ГЦ [1, 3, 9]. Гетеродимер DQ8, связанный с целиакией, присутствует у 5–10% больных. Он также сформирован α- и β-цепочками, кодируемыми DQB1*0302 и DQA1*03, соответственно [3, 8]. Некоторые исследователи отмечают ассоциацию целиакии с антигенами В8 и DR3 [2]. Накоплено значительное количество данных о том, что в возникновении ГЦ важную роль играет не просто наличие определенных антигенов, а комбинация генов HLA I и II классов, определяемая при генном типировании, т.е. речь идет о конкретных гаплотипах [10–12]. Однако суммарная роль HLA-гаплотипов в определении клинических проявлений глютеновой энтеропатии пока не изучена. Во многих исследованиях отмечается, что именно комбинация гаплотипов дает более сильную ассоциацию с целиакией [14].

Целью настоящего исследования стало определение генетической предрасположенности к развитию целиакии.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были проанализированы образцы периферической крови 28 детей с диагнозом «Целиакия, типичная форма», наблюдавшихся в Научном центре здоровья детей РАМН (НЦЗД РАМН) на протяжении 5 лет (основная группа). Диагноз заболевания установлен в соответствии с критериями ESPGHAN [15]. Кровь для исследования была взята у всех детей с подтвержденным диагнозом целиакия. Образцы свежей крови получали из отделения питания здорового и больного ребенка НЦЗД РАМН. Группу сравнения составили образцы периферической крови 17 взрослых пациентов с диагнозом ГЦ, установленным в ЦНИИ гастроэнтерологии. Образцы замороженной крови, хранившиеся при температуре -18°C от 1 до 5 лет, получали из гастроэнтерологического отделения НЦЗД РАМН. Контрольными считались образцы пуповинной крови 2062 здоровых новорожденных, находящиеся на хранении в Банке стволовых клеток (Москва).

Геномную ДНК выделяли из свежих или замороженных образцов крови методом сепарации на магнит-

Таблица. Рабочий температурный режим амплификации для SSO

Шаг	Процесс	Температура, °C	Время
35 циклов	Денатурация	95	15 сек
	Отжиг	60	45 сек
	Элонгация	72	15 сек
1 цикл	Удержание	72	5 мин
Завершение	Удержание	15	постоянно

ных частицах с использованием сертифицированных коммерческих наборов BioSprint 15 DNA Blood kit (Qiagen, США). HLA-типирование проводилось с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и применением двух технологий: ДНК-идентификации с помощью олигонуклеотидных зондов (SSO) и аллельспецифичных праймеров (SSP). Основным методом выявления HLA-специфичностей, характерных для больных целиакией, был метод SSO. Для проведения ПЦР и амплификации определенного локуса HLA (A, B, Cw, DRB или DQB1) готовили рабочую смесь следующего состава: 7,5 мкл 0,6 mM MgCl₂; 15 мкл Mastermix (включающий 30% глицерол, 100 mM KCl, нуклеотиды, биотинилированные праймер и 100 Ед/мл Taq полимеразы); 7,5 мкл ДНК (концентрация 13–15 нг/мкл). Режим амплификации представлен в таблице; общая продолжительность амплификации составляла 1,5 ч.

Искомые специфичности улавливались с помощью метода блот-гибридизации, который представляет собой процесс конъюгации специфических участков ДНК с олигонуклеотидными зондами (Sequence Specific Oligonucleotides), фиксированными на специальные полоски-стрипы. Конъюгированные фрагменты окрашивались пероксидазой (Invitrogen, США). Полученные результаты со стрипа считывались с помощью сканера AutoCam. Интерпретацию результатов проводили в автоматическом режиме с помощью программы Dynal PMP.

Метод SSP, основанный на улавливании в процессе амплификации искомым участкам ДНК аллельспецифическими праймерами (Sequence Specific Primers), использовался для исключения двойных интерпретаций и выявления специфичных аллелей DQB1*.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы OpenEpi 2.3. Количественные признаки представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение. Качественные признаки представлены в виде частоты события (в %). Сравнение качественных признаков проводили с помощью двустороннего критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Возраст пробандов (детей) в основной группе составил от 1 года до 8 лет (средний возраст — 5,9 ± 2,6 года).

Рис. 1. Распределение частоты HLA-аллелей DQB1*02 и DQB1*03 в группах больных целиакией и здоровых новорожденных

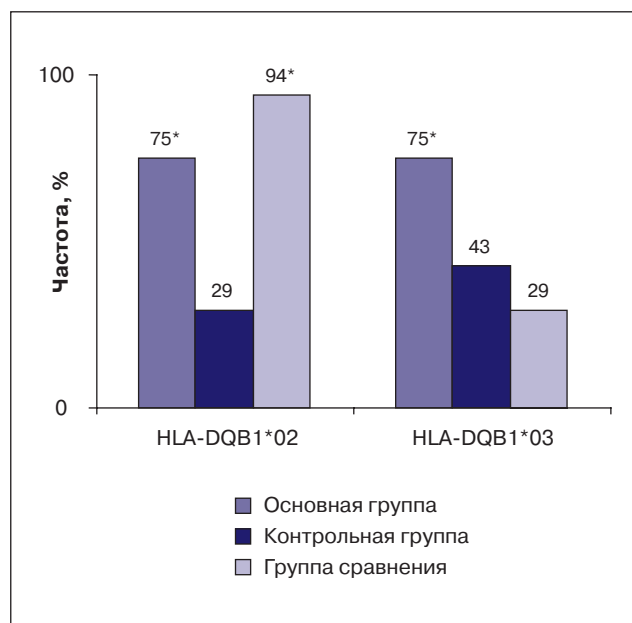
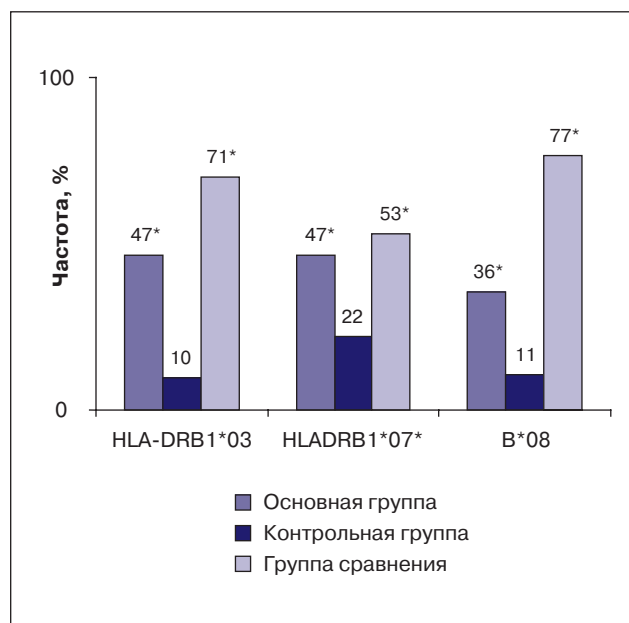


Рис. 2. Распределение частоты HLA-аллелей DRB1*03, DRB1*07 и В*08 в группах больных целиакией и здоровых новорожденных



Примечание. Здесь и на рис. 2, 3

* $p < 0,05$ — по сравнению с показателем в контрольной группе.

Возраст пробандов (взрослых) в группе сравнения варьировал от 19 лет до 81 года (средний возраст — 48 ± 17 лет). Контрольная группа была представлена новорожденными, условно здоровыми детьми.

Данные частоты встречаемости HLA-DQB1*02 и HLA-DQB1*03 в основной, контрольной группах и группе сравнения представлены на рис. 1. Установлено, что HLA-специфичность DQB1*02, соответствующая антигену HLA-DQ2, у детей и взрослых с целиакией встречается в 2,5–3 раза чаще, чем у детей контрольной группы. Специфичность DQB1*03 у детей с целиакией встречается в 1,7 раз чаще, чем у детей контрольной группы. У взрослых пациентов напротив, эта специфичность встречается реже, чем в контрольной группе. Причина таких различий между группами больных не ясна. Данных, объясняющих этот факт, в литературе найдено не было. Возможно, такой результат связан с немногочисленностью группы. Этот факт, несомненно, требует дальнейшего изучения.

Следует отметить, что у 16 (57%) пациентов из основной группы найдены аллельные варианты DQB1*03, которые не экспрессируют гетеродимер DQ8. Эти результаты совпадают с данными, полученными Кондратьевой Е. И. и соавт., согласно которым HLA-маркеры целиакии (DQA1*0501 и DQB1*0201) были обнаружены у 80% больных детей [16].

Анализ частоты встречаемости аллелей DRB1*03, DRB1*07 и В*08 в основной и контрольной группах, а также группе сравнения представлен на рис. 2.

Установлено, что DRB1*03 у больных целиакией встречался в 5–7 раз чаще, чем в контрольной группе. Различия в частоте DRB1*07 были менее значительны: у больных целиакией аллель встречалась в 2–2,5 раза чаще, чем у здоровых новорожденных. Кроме того, были обнаружены статистически значимые различия в частоте В*08. Частота этого аллеля у детей с целиакией была в 3 раза, а у взрослых — почти в 7 раз выше, чем у здоровых новорожденных. Интересно, что у больных детей частота аллеля В*08 была вдвое ниже, чем у взрослых больных. Однако из-за небольшого объема выборки статистически значимых различий обнаружить не удалось. Частоты всех специфичностей локусов А* и Сw*, а также некоторых специфичностей локусов В* (HLA-B*07, В*13–15, В*18, В*27, В*35, В*38–41, В*44–47, В*49–52, В*55, В*58), DRB1* (HLA-DRB1*01, DRB1*04, DRB1*08, DRB1*11–15) и DQB1* (HLA-DQB1*04–06), в сравниваемых группах не различались.

В результате исследования у взрослых и детей, больных целиакией, было выявлено 2 варианта совместно встречающихся специфичностей — гаплотипов, частота которых была существенно выше, чем у детей контрольной группы. Так, гаплотип В*08–DRB1*03–DQB1*0201 обнаруживался у больных целиакией в 6–11 раз чаще, а гаплотип DRB1*07–DQB1*0202 — 5–6 раз чаще, чем у детей контрольной группы (рис. 3). Следует отметить, что встречаемость второго варианта гаплотипа в основной группе и группе сравнения была приблизительно равна, тогда как первый вариант гаплотипа встречался

среди взрослых пациентов вдвое чаще, чем среди детей, больных целиакией. Для выяснения причин этого различия между группами пациентов необходимы дальнейшие исследования. Важно, что 2 пробанда из основной группы и 5 пробандов из группы сравнения имели оба указанных гаплотипа. Однако при изучении историй болезни пациентов не было выявлено каких-либо различий в течении заболевания между пациентами с одним или обоими гаплотипами. Роль таких сочетаний в литературе не описана. Этот факт, несомненно, интересен и также требует дальнейшего изучения.

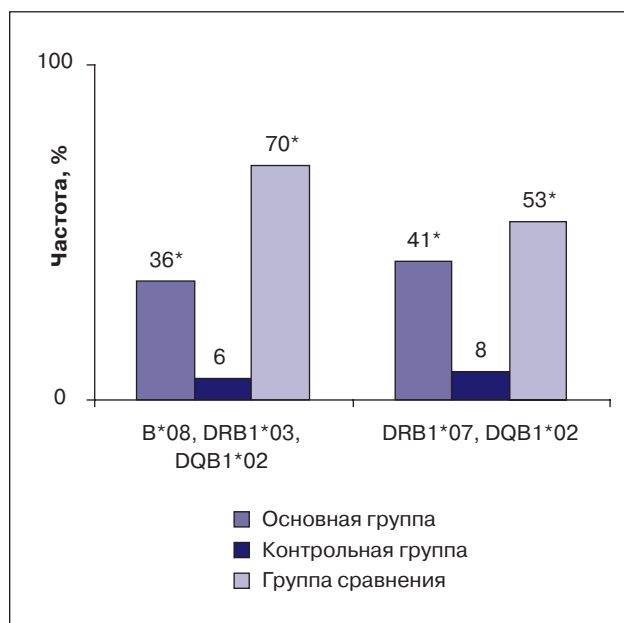
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было выявлено, что значимыми факторами генетической предрасположенности к развитию целиакии являются отдельные специфичности HLA-DQB1*02, DQB1*03, DRB1*03, DRB1*07 и В*08 и гаплотипы В*08–DRB1*03–DQB1*02 и DRB1*07–DQB1*02. Результаты HLA-типирования имеют прогностическое значение, позволяя выявлять индивидуальный риск развития заболевания и проводить генетическое прогнозирование среди здорового населения и в семьях больных целиакией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коровина Н.А., Захарова И.Н., Лысыков Ю.А. Клинические аспекты целиакии у детей. Пособие для практических врачей-педиатров. — М., МедЭкспертПресс, 2007: 10–16, 45–47.
2. Зарецкая Ю.М., Леднев Ю.А. HLA 50 лет: 1958–2008. — Тверь: Триада, 2008: 36–37.
3. Парфенов А.И. Целиакия. Эволюция представлений о распространенности, клинических проявлениях и значимости этиотропной терапии. — М.: Анахарсис, 2007: 38–47.
4. Бельмер С.В. Целиакия. Иммунологическая теория патогенеза целиакии // РМЖ. — 1996; 4 (3): 15.
5. Green P., Jabri B. Coeliac disease // Lancet. — 2003; 362: 383–391.
6. Green P.H., Cellier C. Celiac disease // N. Engl. J. Med. — 2007; 357: 1731–1743.
7. Kim C.Y., Qartsten H., Bergseng E. et al. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2004; 101 (12): 4175–4179.
8. Malamut G., Meresse B., Cellier C., Cerf-Bensussan N. Celiac disease in 2009: a future without gluten-free diet? // Gastroenterol. Clin. Biol. — 2009; 33 (8–9): 635–647.
9. Sollid L.M. Molecular basis of celiac disease // Annu. Rev. Immunol. — 2000; 18: 53–81.
10. Вохмянина Н.В., Эмануэль В.Л. Современная концепция диагностики целиакии // Клинико-лабораторный консилиум. — 2006; 20–22.

Рис. 3. Распределение частоты HLA-гаплотипов В*08-DRB1*03–DQB1*02 и DRB1*07–DQB1*02 у больных целиакией и здоровых новорожденных



11. Louca A.S., Sollid L.M. HLA in celiac disease: unraveling the complex genetics of a complex disorder // Tissue Antigens. — 2003; 61: 105–117.
12. Karell K. Dissecting genetic susceptibility to gluten sensitivity: HLA-linked risk factors in coeliac disease and dermatitis herpetiformis. Academic dissertation. Helsinki, 2003: 17.
13. Tollefsen S., Arentz-Hansen H., Fleckenstein B. et al. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease // J. Clin. Invest. — 2006; 116 (8): 2226–2236.
14. Lopez-Vazquez A., Fuentes D., Rodrigo L. et al. MHC class I region plays a role in the development of diverse clinical forms of celiac disease in a Saharawi population // Am. J. Gastroenterol. — 2004; 99 (4): 662–667.
15. Walker-Smith J.A., Sandhu B.K., Isolauri E. et al. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. Guidelines prepared by the ESPGHAN working group of acute diarrhea // J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. — 1997; 24: 619–620.
16. Кондратьева Е.И., Пузырев В.П., Рудко А.А. и др. Поиск ассоциации полиморфных вариантов генов-модификаторов с целиакией у детей и подростков Томской области // Сибирский вестник гепатологии и гастроэнтерологии. — 2006; 20: 68–72.