

Статья поступила в редакцию 28.01.2016 г.

Шабалдин А.В., Цепоккина А.В., Литвинова Н.А., Шмелевич С.А., Крюков П.М.
 ФГБНУ «НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
 ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет»,
 МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер»,
 МАУЗ «Детская городская клиническая больница № 5»,
 г. Кемерово

АССОЦИАЦИИ МАТЕРИНСКИХ HLA-DRB1* С РИСКОМ ФОРМИРОВАНИЯ У ИХ ДЕТЕЙ СЕПТАЛЬНЫХ ВРОЖДЕННЫХ ПОРОКОВ СЕРДЦА

Лocus HLA-DR включает в себя гены иммунного ответа (I_r), через которые контролируются тимусзависимые иммунные ответы на ксено- и эндобиотики. При беременности I_r гены материнского микроокружения могут детерминировать эффективность защиты зародыша и эмбриона от тератогенов. Исходя из этого, целью настоящего исследования было изучение вклада женских аллелей и генотипов гена HLA-DRB1* в риск развития септальных врожденных пороков сердца. Проведен сравнительный анализ (случай-контроль) частот аллелей и генотипов HLA-DRB1* у женщин, имеющих детей с септальными врожденными пороками сердца (опытная группа, n = 97), и у женщин, имеющих здоровых детей (группа сравнения, n = 54). Выявлено, что у женщин репродуктивного возраста имеются аллели HLA-DRB1*, потенцирующие риск формирования ВПС в последующем поколении: HLA-DRB1*11 (OR = 4,31) и HLA-DRB1*03 (OR = 5,56). Показаны и протективные в отношении данной патологии аллель HLA-DRB1*12 (OR = 0,28) и генотип HLA-DRB1*01,12 (OR = 0,06).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: HLA-DRB1*; септальные врожденные пороки сердца; I_r гены.

Shabaldin A.V., Tsepokina A.V., Litvinova N.A., Shmulevich S.A., Krukov P.M.
 Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
 Kemerovo State University,
 Kemerovo Cardiology Dispensary,
 Children's City Clinical Hospital N 5, Kemerovo, Russia.

THE ASSOCIATION OF MATERNAL HLA-DRB1* WITH RISK OF DEVELOPMENT CONGENITAL SEPTAL HEART DEFECTS AT THEIR CHILDREN

HLA-DR locus includes immune response genes (I_r), which are controlled by thymus-dependent immune responses to endobiotiki and xenon. In pregnancy, maternal microenvironment I_r genes may determine the effectiveness of the protection of the embryo and fetus by teratogens. Accordingly, the purpose of the present study was to investigate the contribution of wo-

men of alleles and genotypes of the gene HLA-DRB1* in the risk of septal congenital heart diseases. The comparative analysis (case-control) allele frequencies and genotype HLA-DRB1* women who have children with septal congenital heart disease (experimental group, n = 97) and women with healthy children (control group, n = 54). HLA-DRB1*03 and HLA-DRB1*11 were associated with a high risk of developing CHD: HLA-DRB1*03 (OR = 5,56) and HLA-DRB1*11 (OR = 4,31). Showing and protective against this disease allele HLA-DRB1*12 (OR = 0,28) and genotype HLA-DRB1*01,12 (OR = 0,06).

KEY WORDS: HLA-DRB1*; septal congenital heart diseases; Ir genes.

Эпидемиологические исследования в Российской Федерации показали, что частота врожденных пороков сердца (ВПС) увеличивается из года в год [1]. Аналогичная тенденция наблюдается и в Кемеровской области [2]. На сегодняшний день не существует системы прегравидарного прогнозирования риска формирования ВПС у плода. Широко применяемый в практическом здравоохранении пренатальный скрининг врожденных аномалий/пороков развития и хромосомных болезней плода позволяет лишь выделить группу беременных с повышенным риском рождения детей с этой патологией. Уточнение характера врожденной аномалии по результатам дополнительных исследований позволяет прервать беременность по медицинским показателям или определиться с объемом и качеством постнатальной лечебной тактики [Приказ МЗ РФ № 457 от 2000 г.]. Прерывание беременности может индуцировать дальнейшие репродуктивные потери у женщины. ВПС являются наиболее распространенной причиной инвалидизации и смертности в детском возрасте [3]. Выделяют ВПС с критическим нарушением гемодинамики, при которых хирургическая медицинская помощь должна быть оказана в первые сутки или в первый месяц после рождения ребенка [4]. Тем самым, ограничение числа рождения таких детей (без прерывания беременности) является важным вкладом в уменьшение младенческой смертности. Соответственно, разработка эффективного метода прогнозирования риска формирования ВПС до наступления беременности является перспективной для современной медицины.

ВПС разнообразны по анатомическим нарушениям и особенностям гемодинамики. Поскольку ВПС по этиологии и патогенезу относят к многофакторным заболеваниям, на развитие которых влияют как эндогенные (в том числе и генетические), так и экзогенные факторы, имеются значительные трудности в поиске генетических маркеров.

В то же время, если принять во внимание роль иммунных взаимодействий в системе «мать-эмбрион/плод» в формировании иммунной защиты против ксенобиотиков с тератогенным эффектом, то можно ограничиться исследованиями генов главного комплекса гистосовместимости (у человека HLA). Продукты этих генов появляются на клетках эмбриона на ранних сроках беременности [5]. В локусе HLA, расположенном на коротком плече 6-й хромосомы,

в положении 21.3, выделяют три класса: I класс детерминирует классические антигены, определяющие совместимость тканей (в этом же классе находятся и эмбриональные HLA, экспрессирующиеся исключительно на клетках зародыша, эмбриона и в трофобласте); II класс (HLA-DR, HLA-DQ) содержит гены иммунного ответа (Iг гены), продукты которых участвуют в презентации антигенов иммунорегуляторным Т-лимфоцитам; III класс включает гены цитокинов и комплемента [5, 6]. HLA является компактным генетическим локусом, уровень кроссинговера в нем не высок и это определяет неравновесное сцепление аллелей I, II и III классов. Таким образом, совместимость супругов по классическим и эмбриональным HLA, приводящая к репродуктивным потерям, может быть определена и по HLA-DRB1*. Типирование HLA-DRB1*, относящегося ко II классу локуса HLA, эффективно еще и с той позиции, что полиморфизм в этом гене определяет антигенный полиморфизм молекулы [6]. Более того, принимая во внимание концепцию о генах иммунного ответа, находящихся в этом сублокусе, обсуждается вопрос о значимости каждого аллеля и генотипа HLA-DRB1* в формировании различной иммунопатологии [7, 8]. Термин «функциональные аллели и генотипы» введен для научного направления «HLA и болезни» в целом, для его звена «HLA и репродукция» в частности. Соответственно, типирование женщин по гену HLA-DRB1* дает представление о потенциальной возможности ограничить материнской иммунной системой тератогенное влияние ксенобиотика на зародыш/эмбрион/плод. Имеются данные о взаимосвязи спонтанного прерывания беременности, развития эмбрио- и фетопатий с определенными женскими аллелями и генотипами HLA-DRB1* [9].

Исходя из этого, **целью настоящего исследования** было изучение вклада женских аллелей и генотипов гена HLA-DRB1* в риск развития септальных врожденных пороков сердца.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Научно-исследовательского института Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний. Исследование одобрено локальным этическим комитетом, все участники эксперимента подписывали информированное согласие о своем участии и участии своих детей в научном исследовании по теме «Разработка перспективных моделей оказания медицинской помощи при болезнях системы кровообращения (ОКС, периферический атеросклероз, ВПС, ППС), в том числе разработка медицинских информационных систем прогнозирования и управления рисками сердечно-сосудистых заболе-

Корреспонденцию адресовать:

ЦЕПОКИНА Анна Викторовна,
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6.
ФГБНУ НИИ КПССЗ.
E-mail: annasepokina@mail.ru

ваний на основании эндогенных (генетических и биохимических) и экзогенных (аэрополлютанты) показателей».

В исследуемую группу включены 97 женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца. Контрольную группу составили 54 женщины условно-здоровых доноров без анамнестических данных о сердечно-сосудистых заболеваниях, сопоставимые с опытной группой по возрасту (26 лет (от 18 до 48) и 23 года (от 17 до 35), соответственно).

Распределение детей с ВПС по диагнозам международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) продемонстрировано в таблице 1. Как видно из таблицы, все исследуемые ВПС были с дефектами межжелудочковой и межпредсердной перегородок. Тетрада Фалло, аномалия Эбштейна и комбинированные атрезии клапана легочной артерии с дефектом межжелудочковой перегородки относились к ВПС, где формировался сброс венозной крови в артериальную (синие ВПС), что усугубляло течение основного заболевания. Гендерный состав группы детей с ВПС был следующий: 45 мальчиков и 42 девочки.

Определяли частоту встречаемости 14 аллелей гена HLA-DRB1 (HLA-DRB1*01; HLA-DRB1*03; HLA-DRB1*04; HLA-DRB1*07; HLA-DRB1*08; HLA-DRB1*09; HLA-DRB1*10; HLA-DRB1*11; HLA-DRB1*12; HLA-DRB1*13; HLA-DRB1*14; HLA-DRB1*15; HLA-DRB1*16; HLA-DRB1*17).

У женщин опытной и контрольной групп выполняли забор периферической крови в пробирку с 0,1 % ЭДТА в объеме 3 мл. Далее проводили выделение геномной ДНК методом фенол-хлороформной экстракции по протоколу. Генотипирование проводили методом полимеразно-цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени наборами компании «ДНК-технология» при помощи детектирующего амплификатора DT-96 в соответствии с протоколом производителя. Контроль качества генотипирования проводили посредством повторного генотипирования 10 % образцов.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ Statistica 10.0. Анализ гендерно-возрастных характеристик проводили при помощи описательной статистики (медиана и доверительный интервал для медианы). Равновесие Харди-Вайнберга определяли при помощи критерия хи-квадрат Пирсона. Об ассоциации разных аллелей и генотипов с заболеваниями судили по величине отношения шансов (odds ratio — OR). Рассчитывали его доверительный интервал (CI) при 95%-ном уровне значимости.

Сведения об авторах:

ШАБАЛДИН Андрей Владимирович, доктор мед. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточных технологий, ФГБНУ «НИИ КПССЗ», г. Кемерово, Россия. E-mail: weit2007@yandex.ru

ЦЕПОКИНА Анна Викторовна, мл. науч. сотрудник, лаборатория геномной медицины, ФГБНУ «НИИ КПССЗ», г. Кемерово, Россия. E-mail: an-paseropkina@mail.ru

ЛИТВИНОВА Надежда Алексеевна, доктор биол. наук, профессор, кафедра физиологии и безопасности жизнедеятельности, ФГБОУ ВПО «КемГУ», г. Кемерово, Россия.

ШМУЛЕВИЧ Светлана Александровна, зав. детским отделением, МБУЗ «ККД», г. Кемерово, Россия.

КРЮКОВ Павел Михайлович, канд. мед. наук, зав. отделением новорожденных, МАУЗ «ДГКБ №5», г. Кемерово, Россия.

Таблица 1
Распределение различных форм ВПС согласно МКБ 10 в основной группе

Диагноз ВПС по МКБ 10	Абсолютное число	Удельный вес, %
Q.21.0	41	42,26
Q.21.1	32	32,99
Q.21.3	17	17,53
Комбинированный Q.22.0 и Q.21.0	4	4,13
Q.22.5	3	3,09
Всего:	97	100

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ наблюдаемых частот генотипов у женщин (контрольной и опытной групп) с расчетными (с учетом уравнения Харди-Вайнберга) показал отсутствие достоверно значимых различий. Эти данные указывают на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга в анализируемой выборке и правомочность сравнения частот аллелей и генотипов между группой женщин с ВПС у их детей и группой женщин, имеющих здоровых детей.

В результате исследования определено, что у женщин, имеющих детей с врожденными пороками сердца, значимо чаще в генотипе встречался HLA-DRB1*03 ($p = 0,0007$) и HLA-DRB1*11 ($p = 0,0036$) гена HLA-DRB1 (табл. 2) по сравнению с женщинами контрольной группы. Показано, что величина отношения шансов (OR) для аллеля HLA-DRB1*11 составила 4,31 (CI 95% 1,67-11,03; $p < 0,01$), а для аллеля HLA-DRB1*03 — 5,56 (CI 95% 2,16-14,24; $p < 0,001$). Таким образом, можно говорить о том, что данные аллели играют предрасполагающую роль в отношении развития ВПС.

Установлено, что женский аллель HLA-DRB1*12, отношение шансов которого равно 0,28 (95% CI 0,67-11,03), обладает протективным эффектом в отношении риска формирования ВПС у потомства.

Следует отметить, что аллели HLA-DRB1*11 и HLA-DRB1*12 кодируют одну антигенную детерминанту, определяемую с помощью серологических методов типирования HLA, как HLA-DR5 [10]. Но дискретное детерминирование аллелями HLA-DRB1*11 и HLA-DRB1*12 риска формирования ВПС у потомства указывает на тонкие иммуногенетические механизмы, по разному влияющие на тератогенез в эмбриональный период онтогенеза.

Известно, что функциональная активность молекул HLA проявляется кодоминантно. С этих пози-

Таблица 2
Сравнительная характеристика частот распределения аллелей HLA-DRB1 у женщин

Аллель	Группа исследования n = 194		Группа сравнения n = 108		Достоверность (P)	OR (CI 95%)
	Абс.	Доля	Абс.	Доля		
HLA-DRB1*01	20	0,10	17	0,16	0,231	0,61(0,24-1,57)
HLA-DRB1*03	22	0,11	2	0,02	0,001	5,56 (2,16-14,24)
HLA-DRB1*04	23	0,12	21	0,19	0,104	0,56 (0,21-1,43)
HLA-DRB1*07	18	0,09	11	0,10	1	0,89 (0,34-2,27)
HLA-DRB1*08	6	0,04	9	0,08	0,083	0,36 (0,13-0,90)
HLA-DRB1*09	2	0,01	1	0,01	0,603	0,93 (0,36-2,38)
HLA-DRB1*10	5	0,03	0	0	0,22	6,30 (2,45-16,14)
HLA-DRB1*11	30	0,15	4	0,04	0,0036	4,31 (1,67-11,03)
HLA-DRB1*12	4	0,02	8	0,07	0,048	0,28 (0,10-0,71)
HLA-DRB1*13	30	0,15	14	0,13	0,671	1,21 (0,47-3,09)
HLA-DRB1*14	3	0,02	0	0	0,488	3,97 (1,54-10,16)
HLA-DRB1*15	26	0,13	18	0,17	0,54	0,77 (0,30-1,97)
HLA-DRB1*16	5	0,03	3	0,03	0,79	0,87 (0,34-2,24)

ций был проведен анализ частоты встречаемости генотипов у женщин, имеющих детей с ВПС, и в группе женщин, имеющих здоровых детей. Показано, что только один женский генотип отрицательно ассоциирован с развитием ВПС у их детей. Так, частота генотипа HLA-DRB1*01,12 в группе женщин, имеющих здоровых детей, была 7,41 %, а в опытной группе этот генотип не встречался (OR = 0,06, CI 95% 0,022-0,148; $p < 0,01$). Как видно из представленных данных, этот генотип включал в себя протективный аллель HLA-DRB1*12.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные в нашем исследовании данные не имеют аналогов в современной научной литературе. Однако многочисленные исследования в области «HLA и болезни» показали ассоциативные связи аллеля HLA-DRB1*03 с аутоиммунными заболеваниями, такими как рассеянный склероз (OR = 2,8; $P_{\text{cor}} = 0,0029$) [11], системная красная волчанка, сахарный диабет (в генотипе HLA-DRB1*03, 04), тиреоидит Хашимото [12], агаммаглобулинемия Брутона (первичный X-сцепленный иммунодефицит). В ранее проведенных исследованиях [12, 13] было показано, что аллель HLA-DRB1*11 также ассоциирован с тиреоидитом Хашимото, ювенильным ревматоидным артритом. По этим многократно полученным в разных популяциях мира ассоциациям аллели HLA-DRB1*03 и HLA-DRB1*11 относят к полиморфным вариантам Iг гена, детерминирующим высокую активность им-

мунной системы индивидуума, что может приводить к нарушению толерантности к аутоантигенам [5].

При беременности, особенно в момент ее формирования и в первые недели гестации (эмбриональный период, закладка органов и систем), иммунная система репродуктивного тракта женщины активно регулируется в отношении аллоантигенов зародыша/эмбриона. Соответственно, у женщин, в геноме которых имеются аллели HLA-DRB1*03 и HLA-DRB1*11, иммунное материнское микроокружение будет активно в отношении аллоантигенов зародыша/эмбриона, в том числе и с иммунопатологическим эффектом.

Особенности детерминирования иммунопатологического влияния на зародыш/эмбрион материнского иммунного микроокружения наглядно видны из полученных данных о положительной ассоциации материнского HLA-DRB1*11 с ВПС у их детей и об отрицательной ассоциации с этой патологией материнского HLA-DRB1*12. Как уже говорилось выше, оба эти аллеля кодируют антигенную детерминанту HLA-DR5. Принимая во внимание известные данные о презентации эпитопов Т-хелперам через молекулы HLA-DR [5], можно предположить, что антиген-презентирующая щель у молекул с аллеля HLA-DRB1*12 более физиологична, чем соответствующая презентующая структура молекулы, кодируемой HLA-DRB1*11. При общей высокой активности Т-хелперов у женщин с HLA-DR5 в геноме специфичность по отношению к презентуемым эпитопам более выражена у HLA-DRB1*12 положительных индивидуумов. Отсутствие перекрестных (мимик-

Information about authors:

SHABALDIN Andrey Vladimirovich, doctor of medical sciences, leading researcher, laboratory of cell technology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia. E-mail: weit2007@yandex.ru

TSEPOKINA Anna Victorovna, junior researcher, laboratory of genomic medicine, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia. E-mail: annacepokina@mail.ru

LITVINOVA Nadezhda Alekseevna, doctor of biological sciences, professor, Kemerovo State University, Kemerovo, Russia.

SHMULEVICH Svetlana Aleksandrovna, chief of children's service, Kemerovo Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russia.

KRUKOV Pavel Mikhailovich, candidate of medical sciences, chief of unit of the newborn, Children's City Clinical Hospital N 5, Kemerovo, Russia.

рирующих) иммунных ответов на схожие аллоантигены приводит к нормальной регуляторной функции Т-хелперов материнского микроокружения при формирующейся беременности. Соответственно, через это свойство молекулы HLA-DR происходит ограничение потенциального тератогенеза.

Предполагается, что молекулы, кодируемые HLA-DRB1*11 и HLA-DRB1*03, имеют нарушения в представлении антигена (через укладку эпитопа в антиген-представляющую щель) Т-хелперам, что приводит к индукции дополнительных клонов этих лимфоцитов. Исходя из этой концепции можно предположить, что у женщин с «патологическими» генотипами HLA-DR в период «фертилизация-имплантация» возрастет уровень перекрестных иммунных реакций, уменьшается специфичность иммунного ответа, и в материнском микроокружении увеличивается уровень локального воспаления при одновременном снижении

степени иммунной защиты зародыша/эмбриона от ксенобиотиков с тератогенным эффектом.

Полученные в пилотном исследовании результаты указывают на перспективность поиска генетических маркеров риска формирования ВПС в последующем поколении в системе HLA родителей.

ВЫВОДЫ:

У женщин репродуктивного возраста выявлены аллели HLA-DRB1* потенцирующие риск формирования ВПС в последующем поколении: HLA-DRB1*11 (OR = 4,31) и HLA-DRB1*03 (OR = 5,56). Протективным аллелем был HLA-DRB1*12 (OR = 0,28), а генотипом – HLA-DRB1*01,12 (OR = 0,06). Механизм детерминирования риска формирования ВПС у зародыша/эмбриона связан с функцией материнских Ig-генов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Бокерия, Л.А. Сердечно-сосудистая хирургия-2014. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения /Л.А.Бокерия, Р.Г. Гудкова. – М.: НЦССХ им. А.Н.Бакулева, 2015. – 226 с.
2. Шабалдин, А.В. Медико-социальные предикторы врожденных пороков сердца у детей крупного промышленного центра /А.В. Шабалдин, С.А. Шмулевич, А.В. Цепочкина //Детские болезни сердца и сосудов. – 2015. – № 1. – С. 36-41.
3. Marcin, M.G. The impact of environmental factors on the occurrence of congenital heart disease in the form of hypoplastic left heart syndrome /M.G. Marcin, T. Skladzien, J.H. Skalski //Kardiologia i Torakochirurgia Polska. – 2015. – V. 12(3). – P. 204-207.
4. Неонатальный скрининг с целью раннего выявления критических врожденных пороков сердца: учеб. пособие для студентов /М.А. Школьникова [и др.] – 2012. – С. 36.
5. Галактионов, В.Г. Эволюционная иммунология: учеб.пособие для ВУЗов /В.Г. Галактионов. – М.: Академия, 2005. – 408 с.
6. Шабалдин, А.В. Иммуногенетические аспекты раннего онтогенеза: Автореф. дис. ... доктора мед. наук /Шабалдин А.В. – Челябинск, 2005. – 38 с.
7. Клиническая значимость определения HLA-DRB1-генотипов, ассоциированных с предрасположенностью или устойчивостью к сахарному диабету 1 типа, в различных этнических группах России /Л.П. Алексеев, И.И. Дедов, Р.М. Хайтов, М.Н. Болдырева, М.В. Шестакова, В.А. Петеркова, С.А. Прокофьев //Сахарный диабет. – 2007. – Т. 10, №. 2. – С. 2-5.
8. Особенности полиморфизма генов системы HLA при нарушениях процессов репродукции /А.Н. Киселева, Г.А. Зайцева, Н.В. Исаева, Е.В. Бутина //Вестник акушера-гинеколога. – 2014. – № 3. – С. 16-19.
9. Ассоциация HLA-DRB1 с репродуктивной патологией у женщин /Л.А. Гордеева, А.В. Шабалдин, А.Н. Глушков, О.А. Глушкова, О.С. Макаренко, Т.А. Симонова, В.И. Минаева //Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 643-648.
10. A meta-analysis of HLA-DR polymorphism and genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy /B. Jin, X.P. Luo, H.C. Ni, W. Shen, H.M. Shi, Y. Li //Molecular biology reports. – 2012. – V. 39(1). – P. 221-226.
11. The association of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles with genetic susceptibility to multiple sclerosis in the Slovak population /J. Michalik, D. Cierny, E. Kantorova, D. Kantarova, J. Juraj et al. //Neurol. Res. – 2016. – P. 1-8.
12. Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A comprehensive review /H.J. Lee, C.W. Li, S.S. Hammerstad, M. Stefan, Y. Tomer //J. Autoimmun. – 2015. – V. 64. – P. 82-90.
13. Singh, S. Genetics of juvenile idiopathic arthritis /S. Singh, S. Bhattad, D. Danda //Int. J. Rheum. Dis. – 2014. – V. 17(3). – P. 233-236.

