

Ассоциация аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 с синдромом Шегрена и продукцией аутоантител к Ro/SSA и La/SSB

Гусева И.А.¹, Чанышев М.Д.², Торгашина А.В.¹, Власенко Н.В.², Хван Ю.И.¹, Самаркина Е.Ю.¹, Шабатина М.В.¹, Хафизов К.Ф.²

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва; ²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

¹Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А; ²Россия, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А

По данным зарубежной литературы, аллели HLA могут быть связаны с предрасположенностью к развитию синдрома Шегрена (СШ), в первую очередь с продукцией аутоантител к антигенам Ro/SSA (анти-Ro/SSA) и La/SSB (анти-La/SSB). В России подобные исследования не проводились.

Цель исследования — изучить взаимосвязь аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 с риском развития СШ и продукцией анти-Ro/SSA и анти-La/SSB.

Материал и методы. В исследование включено 80 пациентов с СШ или болезнью Шегрена (БШ). Все больные соответствовали критериям СШ ACR/EULAR 2016 г. У 67 (83,8%) пациентов выявлены анти-Ro/SSA и анти-La/SSB, причем у 37 имелаась комбинация анти-Ro/SSA/анти-La/SSB, у 30 — только анти-Ro/SSA, и у 13 эти антитела не обнаружены. Контрольную группу составили 160 здоровых доноров крови без аутоиммунных заболеваний (АИЗ) и отягощенной наследственности по АИЗ, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

Высокопроизводительное секвенирование аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 проводилось на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3. Для амплификации экзонов генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 использовались 56 специально разработанных праймеров, содержащих на 5'-концах адаптеры Illumina для последующей индексации. Статистическая обработка данных, включающая сравнение частоты аллелей HLA в группе пациентов с СШ/БШ и в контрольной группе, проводилась в программной среде Python с использованием библиотек NumPy, Pandas, Scikit-learn.

Результаты и обсуждение. В группе больных по сравнению с контрольной группой было отмечено увеличение частоты аллеля HLA-A*01:01:01 (отношение шансов, ОШ 3,28; 95% доверительный интервал, ДИ 1,90–5,67; $p < 0,001$), аллеля B*08:01:01 (ОШ 5,41; 95% ДИ 3,00–9,82; $p < 0,001$), аллеля C*07:01:01 (ОШ 5,12; 95% ДИ 2,57–10,19; $p < 0,001$), аллеля DRB1*03:01:01 (ОШ 3,78; 95% ДИ 2,27–6,30; $p < 0,001$). Кроме того, все 2-, 3- и 4-аллельные комбинации значительно чаще встречались в группе больных по сравнению с контрольной группой. Наиболее статистически значимыми комбинациями аллелей как маркеров риска развития СШ являлись 2-аллельный гаплотип B*08:01:01-DRB1*03:01:01 (ОШ 6,65; 95% ДИ 3,37–13,14; $p < 0,001$) и 4-аллельный гаплотип A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01 (ОШ 6,05; 95% ДИ 2,71–13,51; $p < 0,001$). Наиболее значимая взаимосвязь продукции анти-Ro/SSA/анти-La/SSB была выявлена с гаплотипами B*08:01:01-DRB1*03:01:01 (ОШ 9,50; 95% ДИ 4,16–21,70; $p < 0,001$) и A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01 (ОШ 7,20; 95% ДИ 2,81–18,43; $p < 0,001$). У 30 больных с продукцией только анти-Ro/SSA ассоциация с указанными гаплотипами была менее выражена, хотя и оставалась высокой.

Малая выборка больных без анти-Ro/SSA и анти-La/SSB ($n=13$) не позволила выявить статистически значимые ассоциации с аллелями/гаплотипами HLA.

Заключение. Установлена статистически значимая ассоциация ряда аллелей/гаплотипов HLA, входящих в предковый гаплотип 8.1 (AH8.1), как маркеров предрасположенности к СШ и продукции анти-Ro/SSA и анти-La/SSB.

Ключевые слова: болезнь Шегрена; синдром Шегрена; аутоантитела к Ro/SSA; аутоантитела к La/SSB; HLA; аллели HLA; гаплотипы HLA; предковый гаплотип 8.1 (AH8.1).

Контакты: Ирина Анатольевна Гусева; irrgus@yandex.ru

Для ссылки: Гусева ИА, Чанышев МД, Торгашина АВ, Власенко НВ, Хван ЮИ, Самаркина ЕЮ, Шабатина МВ, Хафизов КФ. Ассоциация аллелей генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 с синдромом Шегрена и продукцией аутоантител к Ro/SSA и La/SSB. Современная ревматология. 2024;18(6):53–60. DOI: 10.14412/1996-7012-2024-6-53-60

Association between the HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-DRB1 gene alleles and Sjögren's syndrome with anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies production

Guseva I.A.¹, Chanyshv M.D.², Torgashina A.V.¹, Vlasenko N.V.², Khvan Yu.I.¹, Samarkina E.Yu.¹, Shabatina M.V.¹, Khafizov K.F.²

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow; ²Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor, Moscow

¹34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia; ²3A, Novogireevskaya Street, Moscow 111123, Russia

Literature data suggest that HLA alleles may be associated with the development of Sjögren's syndrome (SS) and the production of autoantibodies against the Ro/SSA and La/SSB antigens. However, such studies have not been conducted in Russia.

Objective: to study the association between alleles of the HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-DRB1 genes and the risk of developing SS and the production of autoantibodies.

Material and methods. The study included 80 patients with SS or Sjögren's disease (SD). All patients met the ACR/EULAR criteria, 2016. Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies were detected in 67 patients (83.8%), 37 patients had the combination anti-Ro/SSA/anti-La/SSB, 30 patients had only anti-Ro/SSA, and 13 patients did not have these antibodies. The control group consisted of 160 healthy blood donors without autoimmune diseases and without a family history of autoimmune diseases, who were comparable in gender and age to the patient group.

High-throughput sequencing of the alleles of the HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-DRB1 genes was performed on the Illumina MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kit v3. To amplify the exons of the HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-DRB1 genes, 56 specially designed primers containing Illumina adapters at the 5' ends for subsequent indexing were used. Statistical data processing, including comparison of the frequencies of HLA alleles in the group of patients with SS/SD and in the control group, was performed in the Python software environment using the Numpy, Pandas and scikit-learn libraries.

Results and discussion. In the group of patients compared to the control group we observed an increase in frequency for the alleles HLA-A*01:01:01 (OR=3.28, 95% CI [1.90–5.67], $p<0.001$), B*08:01:01 (OR=5.41, 95% CI [3.00–9.82], $p<0.001$), C*07:01:01 (OR=5.12, 95% CI [2.57–10.19], $p<0.001$), DRB1*03:01:01 (OR=3.78, 95% CI [2.27–6.30], $p<0.001$). In addition, all 2-, 3- and 4-allele combinations were significantly more frequent in the patient group compared to the controls. The most significant combinations of alleles as risk markers for the development of SS were the 2-allele haplotype B*08:01:01-DRB1*03:01:01 (OR=6.65, 95% CI [3.37–13.14], $p<0.001$) and the 4-allele haplotype A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01 (OR=6.05, 95% CI [2.71–13.51], $p<0.001$). The most significant correlation between the production of two autoantibodies anti-Ro/SSA/anti-La/SSB was found for the haplotypes B*08:01:01-DRB1*03:01:01 (OR=9.50, 95% CI [4.16–21.70], $p<0.001$) and A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01 (OR=7.20, 95% CI [2.81–18.43], $p<0.001$). In the group of 30 patients who only produced anti-Ro/SSA, the association with the above-mentioned haplotypes was less pronounced, although it remained high. Small sample of patients without anti-Ro/SSA and anti-La/SSB (13 patients), did not allow to determine statistically significant associations with HLA alleles/haplotypes.

Conclusion. A statistically significant association was found between several HLA alleles/haplotypes belonging to ancestral haplotype 8.1 (AH 8.1) as markers of susceptibility to SS and the production of Ro/SSA and La/SSB autoantibodies.

Keywords: Sjögren's disease; Sjögren's syndrome; Ro/SSA autoantibodies; La/SSB autoantibodies; HLA; HLA alleles; HLA haplotypes; ancestral haplotype 8.1 (AH8.1).

Contact: Irina Anatolevna Guseva; irrgus@yandex.ru

For reference: Guseva IA, Chanyshv MD, Torgashina AV, Vlasenko NV, Khvan YuI, Samarkina EYu, Shabatina MV, Khafizov KF. Association between the HLA-A, HLA-B, HLA-C and HLA-DRB1 gene alleles and Sjögren's syndrome with anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies production. *Sovremennaya Revmatologiya*=Modern Rheumatology Journal. 2024;18(6):53–60. DOI: 10.14412/1996-7012-2024-6-53-60

Синдром Шегрена (СШ) — хроническое аутоиммунное лимфопрлиферативное ревматическое заболевание, характеризующееся преимущественно ксеростомией и сухим кератоконъюнктивитом с лимфоцитарной инфильтрацией слюнных и слезных желез. Спектр клинических проявлений СШ распространяется от органоспецифического заболевания, поражающего экзокринные железы, до системного заболевания с вовлечением легких, опорно-двигательного аппарата, почек, гематологическими, гастроэнтерологическими, дерматологическими и неврологическими нарушениями. СШ может возникать как самостоятельное заболевание (первичный СШ, или болезнь Шегрена, БШ) или в сочетании с другими аутоиммунными заболеваниями (АИЗ), таким как ревматоидный артрит (РА), системная красная волчанка и др. (вторичный СШ, или СШ). Важным диагностическим критерием СШ/БШ является обнаружение аутоантител. Антитела к Ro/SSA (анти-Ro/SSA) выявляются у 50–80% пациентов, антитела к La/SSB (анти-La/SSB) — у 30–60%. Также часто присутствуют антинуклеарные антитела и ревматоидный фактор (РФ) [1, 2]. Этиологические факторы СШ/БШ до конца не выяснены. Однако, исходя из современной патогенетической модели, существенный вклад в развитие заболевания могут вносить как генетические и эпигенетические компоненты [3], так и факторы окружающей среды [4]. Не исключают и участия вирусов, особенно вируса Эпштейна–Барр [5] и вируса Коксаки [6].

Среди всех выявленных к настоящему времени генетических факторов именно система HLA связана с наиболее

высокой предрасположенностью к развитию СШ. Важным гистологическим признаком СШ является эктопическая (аномальная) экспрессия молекул МНС (Major Histocompatibility Complex) / HLA (Human Leukocyte Antigen) на железистых эпителиальных клетках, что подтверждено полногеномным транскрипционным профилем эпителиальных клеток малых слюнных желез пациентов с СШ. Экспрессия генов HLA у пациентов с СШ статистически значимо отличается от таковой у здоровых лиц контрольной группы [7]. Исследования на генетических, животных моделях СШ (мыши RbAp48-tg) показали, что эктопическая экспрессия молекул МНС класса II опосредована генетическими факторами. Так, интерферон γ , продуцируемый эпителиальными клетками слюнных желез мышей RbAp48-tg, индуцирует экспрессию регуляторного фактора интерферона 1 (IRF-1) и транскриптора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА), которые являются первичными регуляторами молекул МНС класса II [8]. Из-за эктопической экспрессии молекул МНС класса II железистые эпителиальные клетки могут действовать как антигенпрезентирующие клетки и способствовать развитию СШ-подобного заболевания.

МНС, также известный как локус HLA, занимает около 4 мегабаз (МБ), т. е. 4 млн пар нуклеотидов, на коротком плече хромосомы 6 (p21.3). Молекулы, кодируемые этой областью, участвуют в презентации антигена, регуляции воспаления, функционировании системы комплемента, а также во врожденных и адаптивных иммунных реакциях, что ука-

зывает на важность МНС при иммуноопосредованных, ауто-иммунных и инфекционных заболеваниях [9].

Впервые ассоциация между СШ и антигеном HLA-DR3 класса II при неравновесии по сцеплению с антигеном HLA-B8 класса I была описана у европеоидов [10], а позднее было установлено, что антигены HLA-B8 и HLA-DR3 входят в большое число генов, находящихся в неравновесии по сцеплению и формирующих предковый гаплотип (Ancestral Haplotype, AH) 8.1 [11, 12]. AH8.1 представляет собой чрезвычайно длинную (>4 МБ) комбинацию аллелей: *HLA-A1*, *Cw7*, *B8*, *TNFAB*a2b3*, *TNFN*S*, *C2*C*, *Bf*s*, *C4*Q0*, *C4B*1*, *DRB1*03:01*, *DQA1*05:01*, *DQB1*02:01*, которая чрезвычайно консервативна из-за наличия в этой области неравновесия по сцеплению. Этот устойчивый гаплотип – самый значительный по величине и частоте (7,5–10%) у европеоидов, особенно в странах Северной Европы [13]. Его элементы детерминируют развитие различных звеньев патогенеза ряда АИЗ, являясь маркерами риска этой группы заболеваний [14]. На рисунке представлены гены HLA класса I и II и гены класса III внутри HLA-региона, составляющие гаплотип AH8.1 [15].

Считается, что наиболее важными генами *HLA*, участвующими в формировании предрасположенности к БШ/СШ и продукции аутоантител, являются аллели генов *HLA-DR* и *HLA-DQ* класса II. Поэтому исследования последних 15–20 лет касались главным образом этих генов и было выявлено, что, как и ожидалось, пациенты с СШ различного этнического происхождения несут разные аллели/гаплотипы восприимчивости *HLA*, которые, в свою очередь, ассоциированы с продукцией анти-Ro/SSA и анти-La/SSB [16, 17]. По нашим данным, в России подобные исследования не проводились.

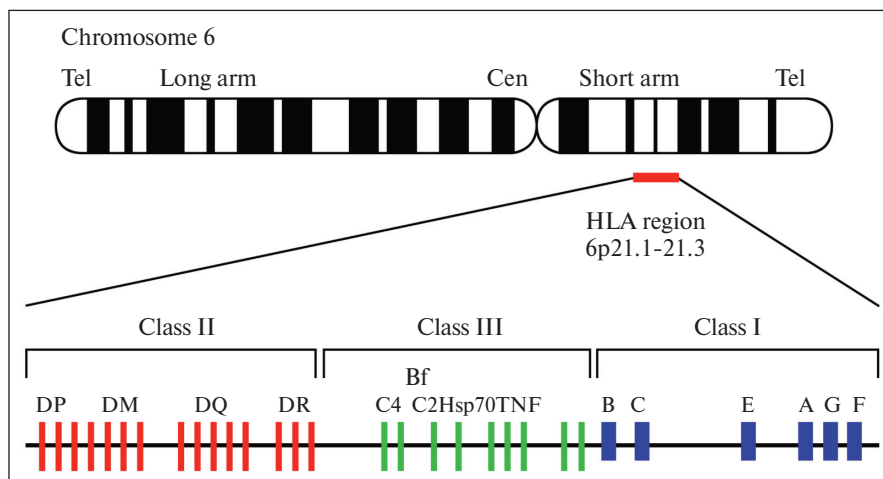
Целью настоящей работы явилось изучение взаимосвязи аллелей генов *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* с риском развития БШ/СШ и продукции анти-Ro/SSA и анти-La/SSB в российской популяции больных.

Материал и методы. В исследование включено 80 больных БШ/СШ. У 61 из них диагностирована БШ как самостоятельное заболевание и у 19 – СШ в сочетании с каким-либо другим АИЗ. Все больные соответствовали критериям СШ ACR/EULAR (American College of Rheumatology / European Alliance of Associations for Rheumatology) 2016 г. [18] и наблюдались в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» (НИИР им. В.А. Насоновой) в 2020–2022 гг. Среди больных преобладали женщины (95%). Средний возраст пациентов на момент включения составил 48,5±14,7 года, медиана длительности заболевания – 7 (3–12) лет. Средний возраст появления первых клинических признаков заболевания – 39,5±15,7 года.

У 67 (83,8%) пациентов были выявлены анти-Ro/SSA и анти-La/SSB, причем у 37 из них имелась комбинация анти-Ro/SSA/анти-La/SSB, а у 30 – только анти-Ro/SSA, и у 13 эти антитела не обнаружены.

Преимущественно железистое поражение наблюдалось у 33 (41,3%) пациентов, у остальных 47 (58,7%) отмечались

системные проявления, включая интерстициальное поражение легких (n=10), тяжелую полиневропатию (n=4), артрит (n=11). Высокая активность заболевания с гиперпротеинемией, гипергаммаглобулинемией, геморрагическими высыпаниями выявлена в 19 (23,8%) случаях. Тяжелое поражение глаз с эпителиопатией роговицы сформировалось у 24 (30,0%) больных. Высокая активность по ESSDAI (EULAR Sjögren's syndrome disease activity index) наблюдалась у 11 (13,8%) пациентов, средняя – у 18 (22,5%), низкая – у 51 (63,8%). У 23 (28,7%) больных течение БШ/СШ сопровождалось глубокой лейкопенией со снижением числа лейкоцитов до <3000/мкл, у 5 (6,3%) – криоглобулинемией.



Строение локуса *HLA* на коротком плече 6-й хромосомы
The structure of the *HLA* locus on the short arm of chromosome 6

У 19 (23,8%) пациентов имелось сочетание БШ/СШ с другими АИЗ, включая РА (n=9), системную склеродермию (n=4), идиопатические воспалительные миопатии (n=3), аутоиммунный гепатит (n=1), саркоидоз с поражением легких (n=1), гипокомплементарный васкулит (n=1).

У всех больных при поступлении в клинику были взяты образцы венозной крови в пробирки с К2ЭДТА (4 мл), которые хранились в замороженном виде при -70 °C до момента выделения ДНК и проведения генотипирования.

В качестве контрольной группы была сформирована выборка из 160 здоровых доноров крови без АИЗ и отягощенной наследственности по АИЗ, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных (материал ФБНУ «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора).

ДНК выделена из образцов крови с помощью коммерческих наборов «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

Высокопроизводительное секвенирование аллелей генов *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* проводилось на платформе Illumina MiSeq с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов).

Предварительно были проведены следующие процедуры.

1. Для амплификации экзонов генов *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1* использовались 56 специально разработанных праймеров, содержащих на 5'-концах адаптеры Illumina для последующей индексации. Амплификация осуществлялась при следующих условиях: 95 °C 3 мин, 16 циклов – 95 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 40 с. Каждая реакция полимеразной

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика больных
Table 1. Clinical and demographic characteristics of patients

Показатель	БШ/СШ (n=80)	БШ (n=61)
Пол, n: женщины/мужчины	76/4	60/1
Возраст на момент включения в исследование, годы, M $\pm$ SD	48,5 $\pm$ 14,7	47,7 $\pm$ 14,2
Длительность заболевания, годы, Me [25-й; 75-й перцентили]	7 [3; 12]	7 [3; 13]
Аутоантитела, n (%):		
АНФ	80 (100)	61 (100)
только АНФ	13 (16,3)	8 (13,1)
АНФ + анти-Ro/SSA	30 (37,5)	22 (36,1)
АНФ + анти-Ro/SSA/анти-La/SSB	37 (46,3)	31 (50,8)
IgM РФ	41 (51,3)	28 (45,9)

Примечание. АНФ — антинуклеарный фактор.

цепной реакции (ПЦР) содержала праймеры, 10 мкл ПЦР-смеси Blue 2 (Amplisens), 1,4 мкл смеси dNTP 4,4 mM (Amplisens), 10 мкл ДНК исследуемого образца и воду mQ до объема 25 мкл.

2. Продукты ПЦР двух пулов смешивались и очищались с помощью магнитных частиц AMPure XP beads в соотношении 0,8:1.

3. Присоединение индексов осуществлялось с помощью ПЦР при следующих условиях: 95 °C 3 мин, 25 циклов — 95 °C 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 45 с. Каждая реакция ПЦР содержала стандартные олигонуклеотидные индексы Illumina в концентрациях 200 нМ, 10 мкл ПЦР-смеси Blue 2 (Amplisens), 1,4 мкл смеси dNTP 4,4 mM (Amplisens), 5 мкл очищенных ампликонов и воду mQ до объема 25 мкл.

4. Полученные ампликоны смешивались, после чего проводилась очистка с помощью магнитных частиц AMPure XP beads в соотношении 0,8:1.

5. Концентрация очищенной библиотеки измерялась с использованием флуориметра Qubit 4.0 и набора Qubit dsDNA HS Assay Kit. Качество полученной библиотеки оценивалось с помощью биоанализатора Agilent 2100 и набора Agilent High-sensitivity DNA kit.

Биоинформатическая обработка данных включала контроль качества прочтений NGS с помощью FastQC. Адаптерные последовательности удалялись из прочтений посредством Trimmomatic. Последовательности праймеров удалялись из прочтений с помощью Cutadapt. Для картирования прочтений на референсный геном GRCh38 использовалась утилита Bowtie2. Аллели *HLA* определялись на основе полученного BAM-файла с использованием программы SpecHLA и верифицировались специально разработанным скриптом.

Статистическая обработка данных, включавшая сравнение частот аллелей *HLA* в группе пациентов с БШ/СШ и в контрольной группе, проводилась в программной среде Python с использованием библиотек NumPy, Pandas, Scikit-learn.

Для сравнения частот аллелей и гаплотипов применялся критерий χ^2 Пирсона. Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы принимался равным 0,05. Для оценки меры риска развития болезни или любого параметра как дихотомической переменной (есть признак, нет признака) вычислялись отношение шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (ДИ). При проверке ряда гипотез ис-

пользовалась поправка Бонферрони. Так как число проверяемых гипотез, как правило, не превышало 10, то для большинства тестов с учетом поправки $p < 0,005$.

Использовались статистическая программа SPSS v.17.0. Применялись методы параметрической и непараметрической обработки результатов. Для данных с нормальным распределением были рассчитаны средние величины (M) и среднеквадратичные отклонения (SD), для сравнения двух независимых выборок использовался t-критерий. При асимметричном распределении вариаций данных были представлены как медиана и интерквартильный интервал (Me [25-й; 75-й процентиля]).

Для сравнения двух независимых выборок применялся критерий Манна—Уитни.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом НИИР им. В.А. Насоновой. Всеми пациентами было подписано информированное согласие.

Результаты. Демографические и клинико-лабораторные показатели больных представлены в табл. 1.

Все клинико-демографические и иммунологические параметры в группах БШ/СШ и БШ статистически значимо не различались.

Анализ взаимосвязи «случай—контроль». В табл. 2 представлены аллели и гаплотипы, частота которых в группах пациентов с БШ/СШ и БШ и в контрольной группе статистически значимо различалась ($p < 0,005$).

Мы не выявили статистически значимых различий в распределении частоты изученных аллелей/гаплотипов *HLA* между группой пациентов только с БШ и общей группой пациентов с СШ/БШ. Следовательно, при вычислении риска развития заболевания включение в одну группу 61 пациента с БШ и 19 больных СШ в сочетании с другими АИЗ не внесло существенных изменений в распределение аллелей/гаплотипов *HLA*.

В локусе А лишь для аллеля *HLA-A*01:01:01* было отмечено увеличение частоты в группе больных по сравнению с контролем. В локусе В увеличение частоты в группе больных наблюдалось для аллеля *B*08:01:01*. В локусе С аллель *C*07:01:01* чаще, а аллель *C*04:01:01* реже встречались в группе больных по сравнению с контрольной группой. Также у больных отмечена более высокая частота аллеля *DRB1*03:01:01* в локусе DRB1. В целом наиболее значимый риск развития БШ/СШ и БШ был связан с аллелем *B*08:01:01* (ОШ 5,41; 95% ДИ 3,00–9,82; $p < 0,001$ и ОШ 5,47; 95% ДИ 2,92–10,27; $p < 0,001$ соответственно).

В табл. 2 также включены гаплотипы в виде комбинаций из 2, 3 и 4 аллелей риска. Все возможные 2-, 3- и 4-аллельные комбинации в подгруппах пациентов встречались значительно чаще, чем в контрольной группе. Часть из них приведена в табл. 2 для демонстрации. По величине ОШ заметно, что совместная комбинация аллелей риска увеличивала predisposition к развитию заболевания. Наиболее статистически значимыми комбинациями аллелей как маркеров риска развития БШ/СШ и БШ являлись 2-аллельный гаплотип *B*08:01:01-DRB1*03:01:01* (ОШ 6,65; 95% ДИ 3,37–

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ / ORIGINAL INVESTIGATIONS

Таблица 2. Частота аллелей и гаплотипов генов *HLA-A, B, C, DRB1* у больных СШ и БШ по сравнению с контрольной группой
 Table 2. Frequency of alleles and haplotypes of the genes *HLA-A, B, C, DRB1* in patients with SS and SD compared to the control group

Аллели и гаплотипы <i>HLA</i>	БШ/СШ (n=80), n (%)	БШ (n=61), n (%)	Контрольная группа (n=160), n (%)	БШ/СШ по сравнению с контролем, ОШ (95% ДИ)	БШ по сравнению с контролем, ОШ (95% ДИ)
<i>A*01:01:01</i>	36 (45,0)	26 (42,6)	26 (16,3)	3,28 (1,90–5,67) p<0,001	3,06 (1,70–5,53) p<0,001
<i>B*08:01:01</i>	39 (48,7)	30 (49,2)	18 (11,3)	5,41 (3,00–9,82) p<0,001	5,47 (2,92–10,27) p<0,001
<i>C*07:01:01</i>	38 (47,5)	29 (47,5)	36 (22,5)	2,46 (1,49–4,06) p=0,001	2,46 (1,43–4,23) p=0,002
<i>C*04:01:01</i>	11 (13,8)	6 (9,8)	55 (34,4)	0,35 (0,18–0,70) p=0,003	0,25 (0,10–0,60) p=0,001
<i>DRB1*03:01:01</i>	45 (56,3)	36 (59,0)	30 (18,8)	3,78 (2,27–6,30) p<0,001	4,05 (2,36–6,95) p<0,001
<i>A*01:01:01-B*08:01:01</i>	24 (30,0)	17 (27,9)	12 (7,5)	5,29 (2,48–11,28) p<0,001	4,77 (2,12–10,73) p<0,001
<i>B*08:01:01-C*07:01:01</i>	30 (37,5)	22 (36,1)	15 (9,4)	5,80 (2,89–11,66) p<0,001	5,45 (2,59–11,49) p<0,001
<i>B*08:01:01-DRB1*03:01:01</i>	34 (42,5)	27 (44,3)	16 (10,0)	6,65 (3,37–13,14) p<0,001	7,15 (3,47–14,72) p<0,001
<i>C*07:01:01-DRB1*03:01:01</i>	29 (36,4)	22 (36,1)	16 (10,0)	5,12 (2,57–10,19) p<0,001	5,08 (2,44–10,59) p<0,001
<i>A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01</i>	24 (30,0)	17 (27,9)	11 (6,9)	5,81 (2,67–12,63) p<0,001	5,23 (2,28–12,00) p<0,001
<i>A*01:01:01-B*08:01:01-DRB1*03:01:01</i>	23 (28,8)	17 (27,9)	11 (6,9)	5,47 (2,50–11,93) p<0,001	5,23 (2,28–12,00) p<0,001
<i>A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01</i>	23 (28,8)	17 (27,9)	10 (6,2)	6,05 (2,71–13,51) p<0,000	5,80 (2,48–13,56) p<0,000

13,14; p<0,001 и ОШ 7,15; 95% ДИ 3,47–14,72; p<0,001 соответственно) и 4-аллельный гаплотип *A*01:01-B*08:01-C*07:01-DRB1*03:01* (ОШ 6,05; 95% ДИ 2,71–13,51; p<0,001 и ОШ 5,80; 95% ДИ 2,48–13,56; p<0,001 соответственно).

В целом распределение аллелей и гаплотипов, а также величина ОШ не различались в подгруппах СШ/БШ и БШ, не выявлено также различий в частоте аутоантител в группах СШ/БШ и только БШ. Поэтому для дальнейшего анализа мы использовали данные группы БШ/СШ.

Анализ взаимосвязи антительного ответа и аллелей/гаплотипов HLA. В группе больных БШ/СШ у 67 (83,8%) пациентов были выявлены анти-Ro/SSA и анти-La/SSB, у 30 из них имелись только анти-Ro/SSA и у 37 – комбинация анти-Ro/SSA/анти-La/SSB. У 13 пациентов эти антитела не обнаружены.

Следующий этап анализа данных заключался в изучении взаимосвязи аллелей/гаплотипов системы *HLA* с продукцией анти-Ro/SSA, анти-La/SSB и их комбинации при сравнении группы больных с контрольной группой (табл. 3). Распределение аллелей и гаплотипов в контрольной группе представлено в табл. 2. Предполагается, что в контрольной группе у здоровых лиц без АИЗ анти-Ro/SSA и анти-La/SSB не

формируются. В табл. 3 приведены наиболее значимые ассоциации аутоантител и их комбинаций с аллелями и гаплотипами *HLA*.

Как следует из табл. 3, наиболее выраженная ассоциация с аллелями *B*08:01:01* и *DRB1*03:01:01*, а также гаплотипами *B*08:01:01-DRB1*03:01:01* и *A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01* была выявлена у 37 больных, имеющих и анти-Ro/SSA, и анти-La/SSB, причем наиболее значимая взаимосвязь продукции этой комбинации аутоантител обнаружена с гаплотипами *B*08:01:01-DRB1*03:01:01* и *A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01*. В группе больных, позитивных только по анти-Ro/SSA, ассоциация с указанными аллелями и гаплотипами была менее выражена, хотя и оставалась значимой.

Малая численность выборки больных без анти-Ro/SSA и анти-La/SSB (n=13) не позволила выявить статистически значимые ассоциации с аллелями/гаплотипами *HLA*.

Обсуждение. Система МНС/HLA представляет собой тесно связанное мультигенное семейство в силу близкого генетического расстояния между генами и выраженного неравновесия по сцеплению. Поэтому мы осуществляли секвенирование генов класса I (*A, B, C*) и класса II (*DRB1*), чтобы

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ / ORIGINAL INVESTIGATIONS

Таблица 3. Ассоциация аутоантител с аллелями/гаплотипами *HLA* у больных СШ, n (%), ОИШ (95% ДИ)
Table 3. Association of autoantibodies with *HLA* alleles/haplotypes in patients with SS, n (%), OR (95% CI)

Показатель	Аллели/гаплотипы <i>HLA</i>			
	<i>B*08:01:01</i>	<i>DRB1*03:01:01</i>	<i>B*08:01:01-DRB1*03:01:01</i>	<i>A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01</i>
Анти-Ro/SSA + анти-Ro/SSA/анти-La/SSB (n=67)	36 (53,7) 6,16 (3,35–11,34) p<0,001	38 (56,7) 3,83 (2,25–6,51) p<0,001	31 (42,3) 7,75 (3,83–15,70) p<0,001	21 (31,3) 6,85 (3,01– 15,58) p<0,001
Анти-Ro/SSA/анти-La/SSB (n=37)	21 (56,8) 6,65 (3,32–13,31) p<0,001	24 (64,9) 4,64 (2,51– 8,58) p<0,001	19 (51,4) 9,50 (4,16–21,70) p<0,001	12 (17,9) 7,20 (2,81–18,43) p<0,001
Анти-Ro/SSA (n=30)	15 (50,0) 5,59 (2,63–11,88) p<0,001	14 (46,7) 2,94 (1,45–5,96) p=0,004	12 (40,0) 6,00 (2,45–14,68) p<0,001	9 (30,0) 6,43 (2,34–17,65) p<0,001

выделить мультигенный гаплотип *HLA*, учитывая, что гены *HLA* не только являются факторами риска АИЗ, но и в первую очередь тесно связаны с инфекционным иммунитетом.

В настоящем исследовании мы изучили взаимосвязь аллелей и гаплотипов генов *A, B, C, DRB1* системы *HLA* с риском развития СШ/БШ, а также продукции анти-Ro/SSA и анти-La/SSB в российской популяции. Наша выборка состояла из 61 пациента с БШ и 19 больных СШ в сочетании с другими АИЗ, которые в западной литературе обозначают как «первичный СШ» и «вторичный СШ» соответственно.

Поскольку в зарубежной литературе молекулярно-генетические исследования проводятся главным образом на выборках с первичным СШ (у нас – БШ), мы первоначально проанализировали, имеются ли статистически значимые различия в распределении аллелей и гаплотипов в группах БШ и БШ/СШ, и выявили отсутствие таких различий. Следовательно, включение 19 больных СШ с другими АИЗ не внесло существенных изменений в распределение аллелей/гаплотипов *HLA* в общей группе (БШ/СШ). Кроме того, как в группе БШ/СШ, так и у больных БШ анти-Ro/SSA и анти-La/SSB выявлялись практически с одинаковой частотой. В связи с этим мы посчитали корректным использовать общую группу БШ/СШ для анализа взаимосвязи аллелей и гаплотипов генов *A, B, C, DRB1* системы *HLA* с риском развития СШ/БШ и продукции анти-Ro/SSA и анти-La/SSB для увеличения мощности исследования.

Исходя из полученных величин риска (ОИШ) развития БШ/СШ и продукции аутоантител, мы пришли к выводу, что 2- и 4-локусная модели (*B*08:01:01-DRB1*03:01:01* и *A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01*) имеют более выраженную взаимосвязь с продукцией аутоантител, чем, например, один аллель *DRB1*03:01:01* или *B*08:01:01*. Выявленная нами ассоциация аллелей и гаплотипов *HLA* с риском развития БШ/СШ, вероятно, вторична за счет взаимосвязи аллелей *HLA* с продукцией анти-Ro/SSA и анти-La/SSB (особенно с комбинацией анти-Ro/SSA/анти-La/SSB), которые часто выявляются у больных БШ/СШ и включены в классификационные критерии СШ [18]. У 7 пациентов, позитивных только по анти-La/SSB, установлено статистически значимое повышение частоты одного из аллелей, входящих в гаплотип АН8.1, а именно *A*01:01:01* (53,8%), по сравнению с контрольной группой (16,2%; ОИШ 4,17; 95% ДИ 1,60–19,83; p=0,005).

Как было сказано выше, первоначально ассоциация СШ и отдельных антигенов/аллелей *HLA* классов I и II и их неравновесное сцепление были обнаружены еще в 70-х годах XX в. [10]. Затруднения, с которыми мы столкнулись при обсуждении собственных и зарубежных результатов, связаны с тем, что начиная с 1990–2000-х годов изучались только гены класса II (*DRB1* и *DBI*), исходя из парадигмы, что именно они участвуют в продукции патогенетически значимых аутоантител [16, 17, 19]. И, действительно, мы получили результаты, схожие с зарубежными данными об ассоциации аллеля класса II *DRB1*03* (*DRB1*03:01:01*) с продукцией комбинации анти-Ro/SSA/анти-La/SSB и только анти-Ro/SSA.

Однако, на наш взгляд, более правомерным является исследование аллелей генов классов I и II системы *HLA* по крайней мере в интервале от *HLA-B* до *HLA-DR/DQ* (см. рисунок), так как эти комбинации генов имеют большое значение для понимания иммунного ответа человека [11].

Устойчивый предковый гаплотип АН8.1 в системе *HLA*, который в нашем исследовании ассоциирован с продукцией аутоантител и вторично с БШ/СШ, особенно интересен, в частности своими двумя факторами. Во-первых, чрезвычайный полиморфизм генов *HLA*, за исключением *DRA* и *DPA*, и высокий уровень гетерозиготности (около 90%) в большинстве популяций человека [20] объясняются преимуществом, которое они могут дать гетерозиготным индивидам, обеспечивая возможность представления большего разнообразия пептидов по сравнению гомозиготными лицами, тем самым улучшая Т-клеточный репертуар и, следовательно, защищая от патогенов [21]. В то же время у европейцев, особенно северян [13] и в русской популяции [22], устойчивый мультигенный предковый гаплотип АН8.1 встречается с наивысшей частотой и во время хромосомной рекомбинации не фрагментируется и целиком передается от родителей потомкам. Вероятно, в давние времена этот гаплотип прошел естественный отбор как наиболее защищающий от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды народы, перемещавшиеся с юга на север.

Во-вторых, генетически детерминированная «гиперреактивность» у носителей гаплотипа 8.1 может, с одной стороны, обеспечить повышенную устойчивость к инфекциям, одновременно увеличивая риск аутоиммунных нарушений.

Согласно данным литературы, носители АН8.1 имеют повышенный риск развития множества АИЗ, в том числе ревматических — СШ, системной красной волчанки, дерматомиозита/полимиозита [12, 14, 23, 24].

Следует отметить, что небольшим недостатком нашей работы явилось то, что в анализ не включали аллели гена *DQB1*, секвенирование которого еще продолжается. Однако в следующей нашей работе будут исследованы все аллели *HLA*, входящие в предковый гаплотип АН8.1, а также взаимосвязь аллелей/гаплотипа 8.1 с клинико-лабораторными параметрами СШ.

Заключение. В России впервые проведено исследование ассоциации аллелей и гаплотипов *HLA-A, B, C, DRB1* у больных СШ с продукцией анти-Ro/SSA и анти-La/SSB. Исследование проводилось методом высокопроизводительного секвенирования (NGS), что позволило с высоким разрешением генотипировать все аллели у больных БШ и в контрольной группе и выделить статистически высокозначимую связь 2-локусных (*HLA-B*01:01:01-DRB1*03:01:01*) и 4-локусных (*A*01:01:01-B*08:01:01-C*07:01:01-DRB1*03:01:01*) гаплотипов с продукцией анти-Ro/SSA/анти-La/SSB. Взаимосвязь с СШ кажется вторичной из-за высокой частоты аутоантител при СШ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сафонова ТН, Васильев ВИ, Лихванцева ВГ. Синдром Шегрена: Руководство для врачей. Москва: Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова; 2013. 600 с.
[Safonova TN, Vasil'ev VI, Likhvantseva VG. Sjögren's Syndrome: A Guide for Physicians. Moscow: Lomonosov Moscow State University; 2013. 600 p.]
2. Negrini S, Emmi G, Greco M, et al. Sjögren's syndrome: a systemic autoimmune disease. *Clin Exp Med*. 2022 Feb;22(1):9-25. doi: 10.1007/s10238-021-00728-6.
3. Thorlacius GE, Björk A, Währen-Herlenius M, et al. Genetics and epigenetics of primary Sjögren syndrome: implications for future therapies. *Nat Rev Rheumatol*. 2023 May;19(5):288-306. doi: 10.1038/s41584-023-00932-6.
4. Björk A, Mofors J, Währen-Herlenius M et al. Environmental factors in the pathogenesis of primary Sjögren's syndrome. *J Intern Med*. 2020 May;287(5):475-492. doi: 10.1111/joim.13032. Epub 2020 Feb 27.
5. Mariette X, Gozlan J, Clerc D, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA by in situ hybridization and polymerase chain reaction in salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome. *Am J Med*. 1991 Mar;90(3):286-94.
6. Triantafyllopoulou A, Tapinos N, Moutsopoulos HM. Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2004 Sep;50(9):2897-902. doi: 10.1002/art.20463.
7. Perez P, Anaya JM, Aguilera S, et al. Gene expression and chromosomal location for susceptibility to Sjögren's syndrome. *J Autoimmun*. 2009 Sep;33(2):99-108. doi: 10.1016/j.jaut.2009.05.001.
8. Yin J, Zheng J, Deng F, et al. Gene Expression Profiling of Lacrimal Glands Identifies the Ectopic Expression of MHC II on Glandular Cells as a Presymptomatic Feature in a Mouse Model of Primary Sjögren's Syndrome. *Front Immunol*. 2018 Oct 31;9:2362. doi: 10.3389/fimmu.2018.02362.
9. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet*. 2009 Jan;54(1):15-39. doi: 10.1038/jhg.2008.5
10. Fye KH, Terasaki PI, Michalski JP, et al. Relationship of HLA-Dw3 and HLA-B8 to Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1978 Apr;21(3):337-42. doi: 10.1002/art.1780210308.
11. Kruskall MS. The major histocompatibility complex: the value of extended haplotypes in the analysis of associated immune diseases and disorders. *Yale J Biol Med*. 1990 Sep-Oct;63(5):477-86
12. Price P, Witt C, Allcock R, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev*. 1999 Feb;167:257-74. doi: 10.1111/j.1600-065x.1999.tb01398.x.
13. Shiina T, Kulski JK. HLA Genetics for the Human Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2024;1444:237-258. doi: 10.1007/978-981-99-9781-7_16.
14. Gambino CM, Aiello A, Accardi G, et al. Autoimmune diseases and 8.1 ancestral haplotype: An update. *HLA*. 2018 Sep;92(3):137-143. doi: 10.1111/tan.13305.
15. Mehra NK, Kaur G. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Med*. 2003 Feb 24;5(7):1-17. doi: 10.1017/S1462399403005957.
16. Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Maier-Moore S, Anaya JM. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility. A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev*. 2012 Feb;11(4):281-7. doi: 10.1016/j.autrev.2011.10.002.
17. Tzioufas AG, Wassmuth R, Dafni UG, et al. Clinical, immunological, and immunogenetic aspects of autoantibody production against Ro/SSA, La/SSB and their linear epitopes in primary Sjögren's syndrome (pSS): a European multicentre study. *Ann Rheum Dis*. 2002 May;61(5):398-404. doi: 10.1136/ard.61.5.398.
18. Shiboski CH, Shiboski SC, Seror R, et al. International Sjögren's Syndrome Criteria Working Group. 2016 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for primary Sjögren's syndrome: A consensus and data-driven methodology involving three international patient cohorts. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jan;76(1):9-16. doi: 10.1136/ard.2016.03.021.
19. Bolstad AI, Wassmuth R, Haga HJ, Jonsson R. HLA markers and clinical characteristics in Caucasians with primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2001 Jul;28(7):1554-62.
20. Solberg OD, Mack SJ, Lancaster AK, et al. Balancing selection and heterogeneity across the classical human leukocyte antigen loci: a meta-analytic review of 497 population studies. *Hum Immunol*. 2008 Jul;69(7):443-64. doi: 10.1016/j.humimm.2008.05.001.
21. Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*. 1975 Jun 28;1(7922):1406-9. doi: 10.1016/s0140-6736(75)92610-0.
22. Хамаганова ЕГ, Леонов ЕА, Абдрахимова АР и др. HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения. *Медицинская иммунология*. 2021;23(3):509-522.
23. [Khamaganova EG, Leonov EA, Abdrakhimova AR, et al. HLA diversity in the Russian population assessed by next generation sequencing. *Meditinskaya immunologiya*. 2021;23(3):509-522. (In Russ.)]
24. Candore G, Lio D, Colonna Romano G, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. *Autoimmun Rev*. 2002 Feb;1(1-2):29-35. doi: 10.1016/s1568-9972(01)00004-0.
25. Matzaraki V, Kumar V, Wijmenga C, Zernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biol*. 2017 Apr 27;18(1):76. doi: 10.1186/s13059-017-1207-1

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

12.06.2024/20.08.2024/24.08.2024

Заявление о конфликте интересов / Conflict of Interest Statement

Статья подготовлена в рамках государственного задания по теме № 1021051402790-6.

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The article was prepared within the framework of the state assignment on topic № 1021051402790-6.

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Гусева И.А. <https://orcid.org/0000-0002-4906-7148>

Чанышев М.Д. <https://orcid.org/0000-0002-6943-2915>

Торгашина А.В. <https://orcid.org/0000-0001-8099-2107>

Власенко Н.В. <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>

Хван Ю.И. <https://orcid.org/0000-0003-2314-1466>

Самаркина Е.Ю. <https://orcid.org/0000-0001-7501-9185>

Шабатина М.В. <https://orcid.org/0009-0009-7981-5360>

Хафизов К.Ф. <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>