

А.Т. Дьяконова, Х.А. Куртанов, Н.И. Павлова,
Н.А. Соловьева, Н.П. Филиппова, Т.Н. Александрова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *HLA*-АЛЛЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОДНОНУКЛЕО- ТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА RS3104413 ГЕНА *HLA-DQA1* СРЕДИ БОЛЬНЫХ СД 1 ТИПА РС(Я)

DOI 10.25789/YMJ.2019.67.03

УДК 575.176

В данной работе проанализирован полиморфизм rs3104413 гена *HLA-DQA1* среди больных СД 1-го типа и контрольной выборки населения Республики Саха (Якутия). Сахарный диабет 1-го типа (СД 1) среди всех форм диабета составляет не более 10-15%, именно СД 1 относят к важнейшей медико-социальной проблеме здравоохранения, так как это заболевание нередко возникает в детском и юношеском возрасте, характеризуется тяжестью течения, ранней инвалидизацией и смертностью.

Ключевые слова: сахарный диабет 1-го типа, *HLA*-типирование, ген *HLA-DQA1*, полиморфизм.

In this work, we analyzed the polymorphism rs3104413 of the *HLA-DQA1* gene among patients with type 1 diabetes and a control sample from the Sakha Republic (Yakutia). Diabetes mellitus type 1 (type 1 diabetes) among all forms of diabetes is no more than 10-15%, and type 1 diabetes is considered to be the most important medico-social problem of health care, since this disease often occurs in childhood and adolescence, it is characterized by the severity of the course, early disability and mortality.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, *HLA* typing, *HLA-DQA1* gene, polymorphism.

Введение. Сахарный диабет (СД) - заболевание, при котором организм не способен правильно метаболизировать углеводы и, в меньшей степени, другие компоненты пищи. Это заболевание обусловлено недостатком инсулина - гормона, который вырабатывается поджелудочной железой и который требуется организму для превращения глюкозы других пищевых компонентов в энергию. Наиболее тяжелой формой диабета является сахарный диабет 1-го типа (СД 1). Несмотря на то, что его доля среди всех форм диабета составляет не более 10-15%, именно СД 1 относят к важнейшей медико-социальной проблеме здравоохранения, так как это заболевание нередко возникает в детском и юношеском возрасте, характеризуется тяжестью течения, ранней инвалидизацией и смертностью [3].

Согласно современным данным, в развитии СД 1 принимает участие большое число генов [3], более половины генетических рисков обусловлено участием полиморфных вариантов генов *HLA*, расположенных на коротком плече хромосомы 6 (6p21). Основной генетический вклад в пред-

расположенность к СД 1 вносят гены системы *HLA*, кодирующие молекулы II класса главного комплекса гистосовместимости человека, в особенности гены *DR* и *DQ* *HLA* II класса, ассоциация которых с развитием СД 1 показана в многочисленных публикациях для различных популяционных групп [1,4].

В России исследования по определению *HLA*-аллелей с использованием однонуклеотидных полиморфизмов не проводятся. В связи с этим на сегодняшний день существует необходимость в проведении исследований, направленных на разработку регионально-адаптированного метода *HLA*-типирования СД 1 с помощью однонуклеотидных полиморфизмов (SNP).

Цель исследования: определение *HLA*-аллелей с использованием однонуклеотидного полиморфизма rs3104413 гена *HLA-DQA1* и его ассоциации с СД 1 типа.

Материал и методы исследования. Экспериментальная часть работ по генотипированию полиморфизма rs3104413, гена *HLA-DQA1* была проведена в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Для исследования использованы 92 образца ДНК из коллекции биоматериала ЯНЦ КМП – уникальная научная установка «Геном Якутии» (рег.№USU_507512). В состав выборки больных вошли 92 пациента больницы ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», ГАУ РС(Я) РБ №1 НЦМ Педи-

атрический центр и эндокринологическое отделение ГБУ РС (Я) «Якутская городская клиническая больница» с диагнозом СД1, в возрасте от 4 лет до 56 лет, проживающих в РС (Я), якутов по этнической принадлежности. По половому признаку 44 чел. (47,8 %) были мужского пола и 48 чел. (52,2 %) женского. Средний возраст пациентов составил 23,04±0,27 года (от 4 до 56 лет), средний возраст пациентов мужского пола – 20,5±2,3 года (от 5 до 40 лет), женского пола – 25,11±2,59 года (от 4 до 56 лет). Контрольную выборку составили 210 якутов, не страдающие СД 1. Этническая принадлежность учитывалась до третьего поколения.

Амплификация области гена *HLA-DQA1*, содержащего однонуклеотидный полиморфизм rs3104413, осуществлялась в процессе ПЦР в реальном времени с использованием пар праймеров и аллель-специфичных зондов для амплификации ДНК, описанных в работе Serr I. и соавт. [6]. Праймеры и зонды синтезированы компанией ООО «Биотех-Индустрия (Lumiprobe)» (Москва, Россия). Последовательность праймеров: Форвард праймер 5'-CAGCTGAGCACTGAGTAG-3', реверс праймер 5'-GCAGTTGAGAAGTGA GAG-3'. Структура зондов: FAM - Probe rs3104413 LPC [6FAM]CAGCCT[+G]CT[+C]TC[+C]TA[+T]TGG[BHQ1], HEX - Probe rs3104413 LPG [HEX]CAGCCT[+G]CT[+G]TC[+C]TA[+T]TGG[BHQ1].

Амплификация проводилась согласно температурной программе (табл. 1).

ЯНЦ КМП: ДЬЯКОНОВА Александра Тимофеевна – м.н.с., dyakonovaa@bk.ru, КУРТАНОВ Харитон Алексеевич – к.м.н., гл.н.с.–руковод. отдела, hariton_kurtanov@mail.ru, ПАВЛОВА Надежда Ивановна – к.б.н., в.н.с. – руковод. лаб., СОЛОВЬЕВА Наталья Алексеевна – к.м.н., с.н.с., ФИЛИППОВА Наталья Павловна – к.б.н., с.н.с., доцент ЯГСХА, АЛЕКСАНДРОВА Туйара Никоновна – м.н.с.

Таблица 1

Температурная программа амплификации полиморфизма rs3104413

Стадия	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Первая денатурация	95	10 с	1
Денатурация	95	30 с	50
Отжиг	55	1 мин	

Измерение сигнала флуоресценции проводилось на втором этапе реакции (55°C – 1 мин). Детекция флуоресценции проводилась «по конечной точке» согласно протоколу прибора «Real-time CFX 96 Touch» («Biorad», США). Пример распределения облаков генотипов проведения ПЦР и детекции флуоресценции «по конечной точке» представлен на рис 1.

Статистический анализ полученных результатов медико-генетического исследования был проведен с помощью программ «Office Microsoft Excel 2010», «Statistica 8.0». Частоту аллелей и генотипов rs3104413 определяли путем

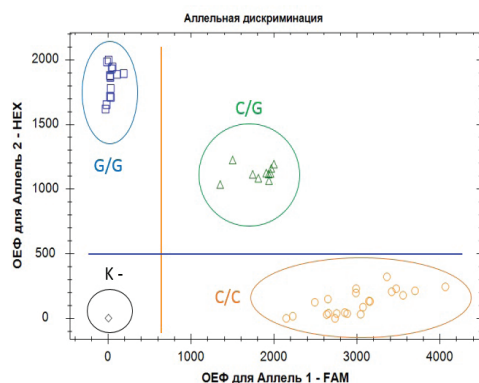


Рис. 1. Распределение облаков генотипов полиморфизма rs3104413 гена *HLA-DQA1*: «К-» - отрицательный контроль, C/C – гомозигота по предковому аллелю С, C/G – гетерозигота, G/G – гомозигота по мутантному аллелю G. Соответствие флуоресцентных красителей: аллель С – канал FAM, аллель G – канал HEX

прямого подсчета. Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Генотипирование аллелей *HLA DRB1* и *DQB1* проведено коммерческими наборами HISTO TYPE, прогенотипированы *HLA* аллели *DRB1*03:01* (*DR3*), *DRB1*04:01* (*DR4*), *DQB1*02:01* (*DQ2*), *DQA1*05:01*.

Параметры амплификации оптимизировались на общий объем реакционной смеси - 10 мкл. ПЦР проводили в соответствии с инструкциями изготовителя в термоциклере MJ Mini Gradient Thermal Cycler («BioRad») (табл. 2).

Результаты амплификации фракционировали в 2%-ном агарозном геле, с бромистым этидием, при напряжении 120-300 В, в течение 45-120 мин. Документирование и визуализацию ПЦР-амплификата проводили посредством фотографирования в UV-свете с помощью геледокументирующего прибора Vilber Lourmat (рис. 2).

Интерпретация результатов генотипирования по наборам HISTO TYPE (обновлен 01/2015_3.19.0 (6.2)) проводилась на основании диаграммы оценки: для HISTO TYPE специфические бэнды имеют размер 220, 200, 800, 150 и 235 п.н. На всех дорожках без аллель-специфического амплификата должен быть четко виден внутренний контроль размером 429 или 1070 п.н. Оценка бэндов проводилась с помощью ДНК маркер «Step 100» (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск, Россия).

Таблица 2

Температурная программа амплификации набором HISTO TYPE

Шаг	Температура, °C	Время	Кол-во циклов
Первая денатурация	96	5 мин	1
Денатурация	96	20 с	5
Отжиг и элонгация	68	1 мин	
Денатурация	96	20 с	10
Отжиг	64	50 с	
Элонгация	72	45 с	
Денатурация	96	20 с	15
Отжиг	61	50 с	
Элонгация	72	45 с	
Заключительная элонгация	72	5 мин	1

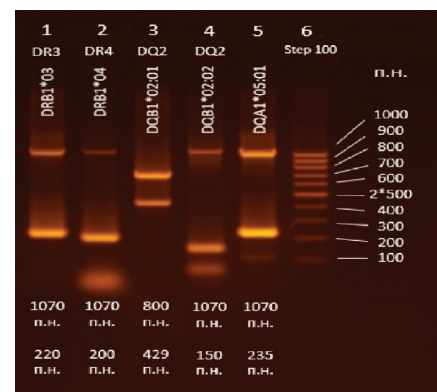


Рис. 2. Электрофореграмма продукта амплификации *HLA DRB1* и *DQB1* в 2%-ном агарозном геле: п.н. – пары нуклеотидов. 1 – *DRB1*03* (220 п.н.), 2 – *DRB1*04* (200 п.н.), 3 – *DQB1*02:01* (800 п.н.), 4 – *DQB1*02:02* (150 п.н.), 5 – *DQA1*05:01* (235 п.н.). Внутренний контроль: 1070 п.н. (1, 2, 4, 5) и 429 п.н. (3). 6 – ДНК маркер «Step100»

Результаты и обсуждение. Результаты анализа распределения частоты аллелей и генотипов полиморфизма rs3104413 среди больных СД 1-го типа и контрольной выборки представлены в табл. 3.

При исследовании полиморфизма rs3104413 отмечается достоверно низкая частота аллеля С (47,1) в группе здоровых индивидов по сравнению с группой людей с СД 1 (78,3%). Расчет отношения шансов показал, что частота встречаемости аллеля С в группе людей с СД 1 достоверно выше (OR-4,036; 95 % CI: 2,71-6,02; $p < 0,001$).

Анализ распределения генотипов показал, что наиболее распространенным генотипом исследуемого полиморфизма в группе людей с СД 1 является C/C (69,6 %), среди не страдающих СД 1 – гомозиготный генотип G/G (41,9 %).

Вычисленный коэффициент сопряженности Пирсона (C) аллеля С (0,278) показывает среднюю силу связи между носительством аллеля С и СД 1-го типа. Нормированное значение коэффициента Пирсона (C') указывает на среднюю связь между носительством аллеля С (0,393) и СД 1.

При анализе выявлено 6 гаплотипов и генов. С гаплотипами *DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01*, *DR3/X*, *DRX/X* был ассоциирован аллель С полиморфизма rs3104413. Аллель G полиморфизма rs3104413 был ассоциирован с носительством гаплотипов *DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02* (*DR4-DQ8*) и *DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:01* (*DR4-DQ7*) (табл. 4).

Согласно литературным данным, более 90% пациентов с СД 1-го типа

Таблица 3

Частота встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs3104413 в группе больных СД 1-го типа и в контрольной выборке

Генотипы, аллели	Больные СД1 (n = 92), абс. (%)	Контрольная выборка (n = 210), абс. (%)	χ^2	OR (95% CI) для аллелей	Значимость, p
C/C	64 (69,6)	76 (36,2)	32,099	4,036 (2,708-6,017)	<0,001*
C/G	16 (17,4)	46 (21,9)			
G/G	12 (13,0)	88 (41,9)			
C	144 (0,783)	198 (0,471)	49,184		<0,001**
G	40 (0,217)	222 (0,529)			

Примечание. Достигнутый уровень значимости при сравнении распределения генотипов (*) и частоты аллелей (**) в группах. n – численность выборок, χ^2 – с поправкой Йейтса.

Таблица 4

Идентификация гаплотипов и генотипов HLA с помощью однонуклеотидного полиморфизма rs3104413

Гаплотипы по генам HLA	Количество человек с данным гаплотипом	Генотип, %			Аллель С	Аллель G
		C/C	C/G	G/G		
DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01	16	87,5	12,5	0	0,938	0,063
DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (DR4-DQ8)	20	0	40	60	0,200	0,800
DR3/4-DQ8	8	0	100	0	0,500	0,500
DR3/X	50	100	0	0	1,000	0,000
DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:01 (DR4-DQ7)	132	0	33,3	66,7	0,167	0,833
DRX/X	76	100	0	0	1,000	0,000

Примечание. DRX/X – отсутствие как DR3, так и DR4; DR3/X – вариант носительства 1-го типа DR3 и типа DR3, не относящегося к DR4.

являются носителями либо HLA-DR3, DQB1*0201 (DR3-DQ2), либо DR4, DQB1*0302 (DR4-DQ8). Около 30% пациентов имеют комбинированный генотип DR3/4, который ассоциирован с наибольшей восприимчивостью к заболеванию [2]. Ассоциированным ранее с низким риском развития заболевания является гаплотип DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:01 (DR4-DQ7) [5].

Таким образом, исследования данного полиморфизма rs3104413 при определении гаплотипа недостаточно,

требуется дальнейшие исследования в комплексе с другими SNP.

Заключение. При исследовании было выявлено 6 гаплотипов и генов. С гаплотипами DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01, DR3/X, DRX/X был ассоциирован аллель С полиморфизма rs3104413. Аллель G полиморфизма rs3104413 был ассоциирован с носительством гаплотипов DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (DR4-DQ8) и DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:01 (DR4-DQ7).

Отмечается достоверно низкая ча-

стота аллеля С (47,1) в контрольной выборке по сравнению с группой больных СД 1-го типа (78,3 %) в полиморфизме rs3104413. Расчет отношения шансов показал, что частота встречаемости аллеля С в группе людей с СД 1-го типа достоверно выше (OR- 4,036; 95 % CI: 2,71-6,02; p<0,001).

Таким образом, полученные данные могут быть использованы в качестве биологических предикторов развития СД 1-го типа с целью проведения своевременных персонализированных профилактических мероприятий.

Исследование было проведено в рамках НИР «Изучение генетической структуры и груза наследственной патологии популяций Республики Саха (Якутия)».

Литература

1. Кураева Т.Л. Роль генетических факторов в формировании разного уровня заболеваемости сахарным диабетом 1-го типа в Европе и Российской Федерации / Т.Л. Кураева, Т.Ю. Ширяева, С.А. Прокофьев // Проблемы эндокринологии. – 2011. – №1. – С.19-25.
2. Kuraeva T.L. The role of genetic factors in the formation of different levels of type 1 diabetes mellitus in Europe and the Russian Federation / T.L. Kuraeva, T.Yu. Shiryayeva, S.A. Prokofiev // Problems of Endocrinology. – 2011. – №1. – P.19-25.
3. Волынкина А.П. Генетические маркеры сахарного диабета (часть 1) / А.П. Волынкина, И.П. Горшков, О.А. Прилуцкая // Успехи современной науки – 2017. – Т.2, №5. – С.123-126
4. Volynkina A.P. Genetic markers of diabetes mellitus (part 1) / A.P. Volynkina, I.P. Gorshkov, O.A. Prilutskaia // Modern science success. – 2017. – Vol. 2, №5. – P.123-126.
5. Atkinson M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes / M.A. Atkinson // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2012. – V. 2, №. 11. – P. a007641. Published., doi:10.1101/cshperspect.a007641
6. Redondo M.J. Genetics of type 1 diabetes / M.J. Redondo, A.K. Steck, A. Pugliese // Pediatric Diabetes. – 2017. – Vol.19(3). – P.346-353, doi: 10.1111/pedi.12597
7. Nguyen C. Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms / C. Nguyen, Varney MD, Harrison LC, Morahan G // Diabetes. – 2013. – P. DB_121398. doi: 10.2337/db12-1398
8. Type 1 diabetes vaccine candidates promote human Foxp3+ Treg induction in humanized mice / Serr I. [et al.] // Nature communications. – 2016. – V. 7. – P. 10991.