

АССОЦИАЦИЯ ГЕНОВ DRB1, DQA1, DQB СИСТЕМЫ HLA II КЛАССА С РИСКОМ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА В ЯКУТСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Соловьева Н.А.¹, Куртанов Х.А.¹, Павлова Н.И.¹, Дьяконова А.Т.¹, Филиппова Н.П.¹, Александрова Т.Н.¹

¹ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск, sonata608@yandex.ru

В статье представлены результаты молекулярно-генетического исследования, проведенного с использованием типирования генов HLA класса II (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*). Проанализированы 92 образца ДНК больных с подтвержденным диагнозом «сахарный диабет 1-го типа» в возрасте от 4 лет до 56 лет, проживающих в Республике Саха (Якутия). Популяционную выборку составили 210 индивидов без признаков сахарного диабета 1-го типа. Все участники исследования являлись якутами. Этническая принадлежность участников исследования учитывалась до третьего поколения. Исследование проводилось с письменного согласия участников; для участников, не достигших возраста 18 лет, согласие подписывали родители. В результате проведенного молекулярно-генетического исследования больных сахарным диабетом 1-го типа были выявлены три наиболее значимых гаплотипа, ассоциированных с риском развития данного заболевания. Максимальное значение RR было установлено для гаплотипа DR3/X-4,234, его значение для гаплотипа DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02(DR4-DQ8) составило 3,917, а для гаплотипа DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01 значение RR составило 3,763. Таким образом, полученные результаты могут быть использованы в качестве неблагоприятных маркеров при прогнозировании рисков предрасположенности к сахарному диабету 1-го типа в популяции якутов.

Ключевые слова: гены HLA II класса, сахарный диабет 1-го типа, полиморфизм, якуты

ASSOCIATION OF DRB1, DQA1, DQB GENES OF THE HLA II CLASS SYSTEM WITH RISK OF DEVELOPMENT OF TYPE 1 DIABETES MELLITUS IN THE YAKUT POPULATION

Solovyova N.A.¹, Kurtanov Kh.A.¹, Pavlova N.I.¹, Dyakonova A.T.¹, Filippova N.P.¹, Aleksandrova T.N.¹

¹Federal public budgetary scientific institution «Yakut science center of complex medical problems», Yakutsk, sonata608@yandex.ru

The article presents the results of a molecular genetic study conducted using the typing of HLA class II genes (*DRB1*, *DQA1*, *DQB1*). 92 DNA samples of patients with a confirmed diagnosis of type 1 diabetes mellitus, aged 4 to 56 years, residing in the Sakha Republic (Yakutia) were analyzed. The population sample consisted of 210 individuals with no signs of type 1 diabetes. All study participants were Yakuts. Ethnicity of the study participants was taken into account until the third generation. The study was conducted with the written consent of the participants, for participants under the age of 18 - the consent was signed by the parents. As a result of a molecular genetic study of patients with type 1 diabetes mellitus, the three most significant haplotypes associated with the risk of developing this disease were identified. The maximum RR value was set for DR3 / X-4.234 haplotype, its value for DRB1 * 04: 01 – DQA1 * 03: 01-DQB1 * 03: 02 (DR4-DQ8) haplotype was 3.917, and for the DRB1 * 03-haplotype DQA1 * 05: 01-DQB1 * 02: 01. The value of RR was 3.763.

Thus, the obtained results can be used as unfavorable markers in predicting the risks of predisposition to type 1 diabetes in the Yakut population.

Keywords: HLA class II genes, type 1 diabetes mellitus, polymorphism, Yakuts

Сахарный диабет 1-го типа (СД 1-го типа) является многофакторным заболеванием, обусловленным взаимодействием генетических и средовых факторов. Поиск генов, демонстрирующих ассоциацию с СД 1-го типа, необходим для более точного понимания механизмов развития заболевания и разработки доклинической диагностики с целью профилактики заболевания. На сегодняшний день убедительно доказана роль большого

числа генов в развитии СД 1-го типа [1]. Установлено, что значительная доля генетических рисков для этого заболевания связана с полиморфными вариантами генов системы *HLA*, расположенных на коротком плече хромосомы 6 (6p21). Исследованиями продемонстрировано, что наиболее значимый вклад в предрасположенность к развитию СД 1-го типа вносят гены системы *HLA* 2-го класса главного комплекса гистосовместимости человека, в особенности гены *DR* и *DQ*, усиливающие взаимное влияние [2, 3, 4].

Анализ гаплотипов, предрасполагающих к развитию СД 1-го типа в европейских популяциях, включая российскую, продемонстрировал наибольшую значимость для 2 гаплотипов – *DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302* и *DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201*, обозначаемых как *DQ2* и *DQ8*. Результатами некоторых исследований показано, что полиморфизм генов *HLA* может носить протективную роль [4, 5]. Кроме того, отмечено, что гены системы *HLA* могут участвовать в формировании таких клинических особенностей болезни, как возраст начала болезни или исход активного клеточного аутоиммунитета. Так, комбинация гаплотипов *DR3* и *DR4* не только предрасполагает к развитию СД 1-го типа, но и влияет на возраст начала болезни. Данная комбинация гаплотипов встречается значимо чаще в группе пациентов с началом СД 1-го типа в раннем детстве [6]. Анализ частот генотипов высокого риска *DQ2/DQ8* в русской популяции продемонстрировал их преобладание у детей, заболевших до пятилетнего возраста (33%), по сравнению с детьми, у которых СД 1-го типа манифестировал в возрасте старше 10 лет (23%) [7].

Оценка аллельных сочетаний генов системы *HLA* установила, что они способны по-разному влиять на риск развития СД 1-го типа. Так, высокая степень риска была установлена для *HLA-DRB1*03 (DR3)* и *HLA-DRB1*04(DR4)*, причем наиболее высокий риск отмечался у лиц с гетерозиготным генотипом *DQA1*05:01-DQB1*02:01(DQ2)*, *DQA1*03-DQB1*03:01 (DQ8)*. Кроме того, было установлено, что некоторые аллельные сочетания характеризовались протективным действием по отношению к развитию диабета (например, аллель *HLA-DRB1*04 (DR4)* в сочетании с *DQA1*03-DQB1*03:01 (DQ7)* образуют гаплотип, ассоциированный с низким риском развития СД 1-го типа) [8, 9].

Целью настоящего исследования было определение этнических особенностей вариантов генов *HLA-DR* и *HLA-DQ*, ассоциированных с сахарным диабетом 1-го типа, в популяции якутов посредством изучения молекулярной структуры и распространенности гаплотипов в локусе *HLA*.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены участники, не имеющие родственных связей и добровольно подписавшие информированное согласие на проведение генетического исследования; для участников, не достигших совершеннолетия, информированное согласие

подписывали родители.

Для каждого участника исследования была разработана индивидуальная генетическая карта, содержащая клинико-функциональные и лабораторные показатели, а также генеалогические данные участника. Каждому участнику был присвоен идентификационный номер и создан регистр участников исследования.

Все больные прошли тщательное медицинское обследование врачами-эндокринологами больницы ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», ГАУ РС(Я) РБ № 1 НЦМ Педиатрический центр и эндокринологического отделения ГБУ РС(Я) «Якутская городская клиническая больница» г. Якутска. При дифференциации диагноза пользовались классификацией, одобренной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ, 1999), и рекомендациями Американской диабетической ассоциации (2010).

Экспериментальная часть работ по генотипированию аллелей *HLA DRB1* и *DQB1* была проведена в лаборатории наследственной патологии отдела молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем (ЯНЦ КМП). Для исследования использовались образцы ДНК из коллекции биоматериала ЯНЦ КМП с использованием УНУ «Геном Якутии» (рег. № USU_507512). Выборка состояла из 92 пациентов больницы ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», ГАУ РС(Я) РБ № 1 НЦМ Педиатрический центр и эндокринологического отделения ГБУ РС(Я) «Якутская городская клиническая больница» г. Якутска. Все пациенты имели диагноз СД 1-го типа, возраст от 4 лет до 56 лет, проживали в РС (Я) и являлись якутами по этнической принадлежности. В число пациентов вошли 44 (47,8 %) мужчины и 48 женщин. Средний возраст пациентов составил $23,04 \pm 0,27$ года, средний возраст пациентов мужского пола – $20,5 \pm 2,3$ года (от 5 до 40 лет), женского пола – $25,11 \pm 2,59$ года (от 4 до 56 лет). Популяционную выборку составили 210 якутов, не страдающих СД 1-го типа. Этническая принадлежность учитывалась до третьего поколения.

Генотипирование аллелей *HLA DRB1* и *DQB1* проведено коммерческими наборами HISTOTYPE, 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. 1).

Температурная программа амплификации набором HISTOTYPE

Шаги	Температура	Время	Количество циклов
Первая денатурация	96°C	5 минут	1 цикл
Денатурация	96°C	20 секунд	5 циклов
Отжиг и элонгация	68°C	1 минута	
Денатурация	96°C	20 секунд	10 циклов
Отжиг	64°C	50 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Денатурация	96°C	20 секунд	15 циклов
Отжиг	61°C	50 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Заключительная элонгация	72°C	5 минут	1 цикл

Результаты амплификации фракционировали в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием при напряжении 120–300 В в течение 45–120 минут. Документирование и визуализацию ПЦР-амплификата проводили посредством фотографирования в UV-свете с помощью гель-документирующего прибора VilberLourmat (рис. 1).

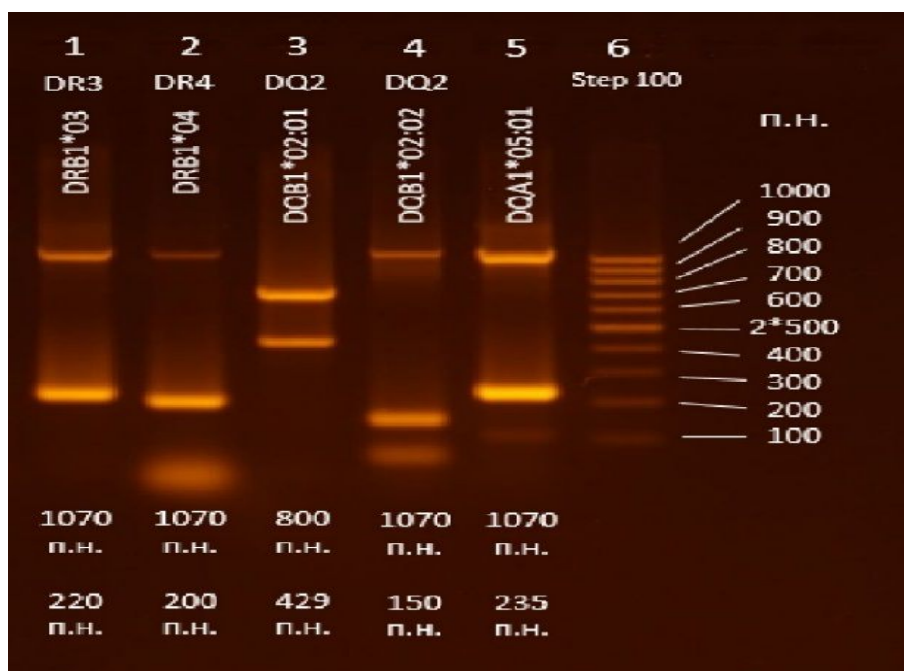


Рис. 1. Электрофореграмма продукта амплификации HLA DRB1 и DQB1 в 2%-ном агарозном геле (генотипирование HLA DRB1 и DQB1 с помощью коммерческих наборов HISTO TYPE). Примечание: п.н. – пар нуклеотидов. 1 – DRB1*03 (220 п.н.); 2 – DRB1*04 (200 п.н.); 3 – DQB1*02:01 (800 п.н.); 4 – DQB1*02:02 (150 п.н.); 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»

Интерпретация результатов генотипирования по наборам HISTOTYPE проводилась на основании диаграммы оценки (обновлен 01/2015_3.19.0 (6.2)): для HISTOTYPE специфические бэнды имеют размер 220, 200, 800, 150 и 235 п.н. Во 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).

Для получения основных показателей внутривнутрипопуляционной изменчивости использовали программу статистической обработки «SPSS –Statistical Package for the Social Sciences» версии 27.

При анализе сопряженности частоты неблагоприятного аллеля с СД 1-го типа использовали четырехпольную таблицу сопряженности (табл. 2).

Таблица 2

Четырехпольная таблица сопряженности

	Больные СД 1-го типа	Контрольная выборка	Всего
Аллель риска	A	B	A + B
Аллель риска отсутствует	C	D	C + D
Всего	A + C	B + D	A + B + C + D

Для расчета относительного риска использовали четырехпольную таблицу сопряженности и следующую формулу:

$$RR = \frac{\frac{A}{A+B}}{\frac{C}{C+D}} = \frac{A \times (C+D)}{C \times (A+B)}$$

где RR – относительный риск; A, B, C, D – количество наблюдений в ячейках таблицы сопряженности.

Для оценки значимости относительного риска рассчитывались границы 95%-ного доверительного интервала (95% ДИ, или 95% CI, от англ. confidenceinterval). Результаты считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Результаты оценки частот распределения ключевых гаплотипов генов системы *HLA* II класса, ассоциированных с развитием СД 1-го типа, представлены в таблице 3. По результатам молекулярно-генетического исследования больных СД 1-го типа выявлены три наиболее значимых гаплотипа, ассоциированных с риском развития заболевания.

Таблица 3

**Частота встречаемости гаплотипов
в группе больных СД 1-го типа и контрольной выборке**

№	Гаплотипы и генотипы по генам HLA	Частота в группе больных СД 1 типа, абс.	$p_i \pm s_{p_i}$	Частота в контрольной группе, абс.	$p_i \pm s_{p_i}$	RR (DI 95)	p
1.	<i>DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01</i>	16	17,4±2,8	0	-	3,763 (3,104 – 4,563)	<0,001
2.	<i>DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (DR4-DQ8)</i>	20	21,8±3,0	0	-	3,917 (3,209 – 4,781)	<0,001
3.	<i>DR3/4-DQ8</i>	6	6,5±1,8	2	0,95±0,47	2,564 (1,655 – 3,972)	0,018
4.	<i>DR3/X</i>	42	45,6±3,7	8	3,8±0,93	4,234 (3,212 – 5,580)	<0,001
5.	<i>DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:01 (DR4-DQ7)</i>	0	-	132	62,85±2,4	0,000	<0,001
6.	<i>DRX/X</i>	8	8,7±2,1	68	32,4±2,3	0,283 (0,144-0,557)	<0,001

Примечание: *DRX/X* – отсутствие как *DR3*, так и *DR4*; *DR3/X* – вариант носительства 1-го типа *DR3* и типа *DR3*, не относящегося к *DR4*, p_i – частота встречаемости гаплотипа, s – ошибка частоты

Максимальное значение RR было установлено для гаплотипа *DR3/X* – 4,234, его значение для гаплотипа *DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02(DR4-DQ8)* составило 3,917 и для гаплотипа *DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01* оно составило 3,763 (рис. 2).

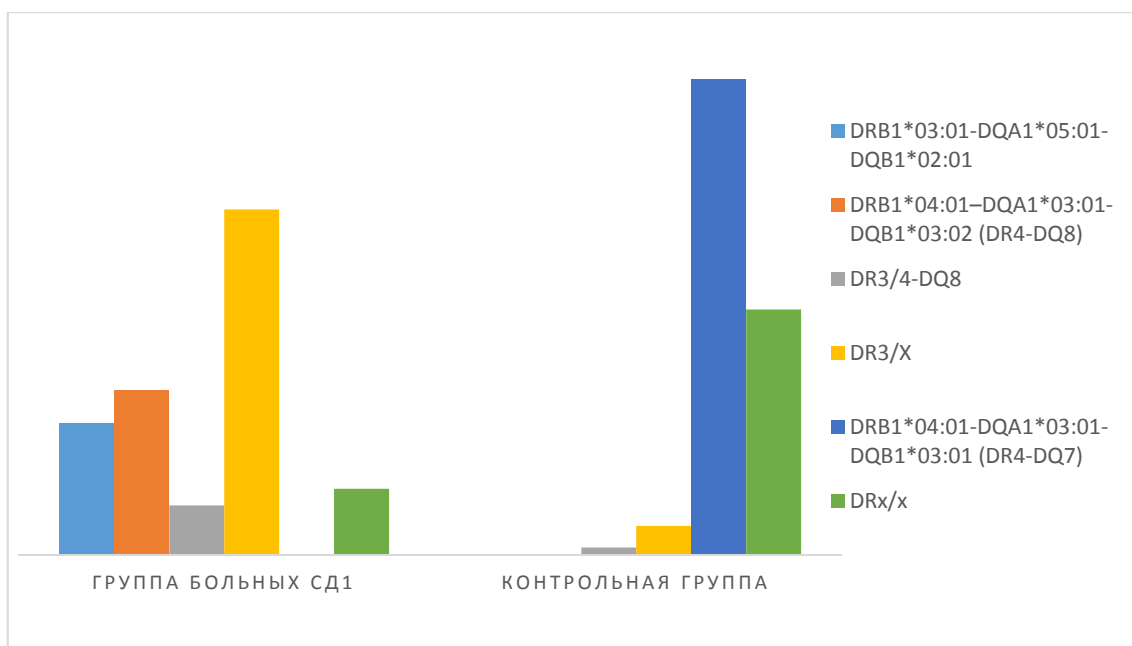


Рис. 2. Распределение частот гаплотипов генов HLA среди больных СД 1-го типа и контрольной группы

Полученные результаты согласовываются с литературными данными – порядка 90% пациентов СД 1-го типа характеризуются носительством *HLA-DR3*, *DQB1*0201 (DR3-DQ2)* или *DR4*, *DQB1*0302 (DR4-DQ8)*. Для 30% пациентов характерно носительство комбинированного генотипа *DR3/4*, ассоциированного с наибольшей восприимчивостью к заболеванию [10]. Результаты сравнительного анализа частот распределения предрасполагающих аллелей среди якутской популяции и русской популяции г. Москвы показали, что в якутской популяции среди больных СД 1-го типа чаще встречаются аллели *DRB1*04* и *DRB1*17(03)*. Авторами также было показано, что *DRB1*17(03)* в якутской популяции является самым сильным предрасполагающим аллелем (RR=8,47), а в московской популяции – *DQB1*03:04* (RR =8,94) [5].

В контрольной группе достоверно чаще выявлялся гаплотип *DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:01 (DR4-DQ7)* – 62,85±2,4, ассоциированный ранее с низким риском развития заболевания [9].

Заключение

По результатам молекулярно-генетического исследования больных СД 1-го типа выявлены три наиболее значимых гаплотипа, ассоциированных с риском развития заболевания. Так, значение RR для гаплотипа *DR3/X* составило 4,234, для гаплотипа *DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (DR4-DQ8)* составило 3,917 и для гаплотипа *DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01* составило 3,763. Полученные результаты могут быть использованы в качестве неблагоприятных маркеров при прогнозировании рисков предрасположенности к сахарному диабету 1-го типа в популяции якутов.

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

Список литературы

1. Atkinson M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2012. Vol. 2. №. 11. P. a007641. DOI:10.1101/cshperspect.a007641.
2. Кураева Т.Л., Ширяева Т.Ю., Прокофьев С.А. Роль генетических факторов в формировании разного уровня заболеваемости сахарным диабетом 1-го типа в Европе и Российской Федерации // Проблемы эндокринологии. 2011. №1. С.19-25.
3. Redondo M.J., Steck A.K., Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. Pediatric Diabetes. 2017. Vol.19(3). P.346-353, DOI: 10.1111/pedi.12597.
4. Morran M.P., Vonberg A., Khadra A., Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. Molecular aspects of medicine. 2015. Vol. 42. P. 42-60. DOI:

10.1016/j.mam.2014.12.004.

5. Титович Е.В., Кураева Т.Л., Данилова Г.И. Ассоциация сахарного диабета 1 типа с полиморфными аллелями генов HLA класса II в якутской и русской популяциях // Сахарный диабет. 2009. №3. С. 28-32.
6. Patterson C.C., Dahlquist G.G., Gyürüs E., Green A., Soltész G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *The Lancet*. 2009. Vol. 373. №. 9680. P. 2027-2033. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60568-7.
7. Дедов И.И., Шестакова М.В., Кураева Т.Л., Титович Е.В., Никонова Т.В. Нозологическая гетерогенность, молекулярная генетика и иммунология аутоиммунного сахарного диабета // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. Т. 70. №. 2. С.132-138. DOI: 10.15690/vramn.v70i2.1305.
8. Noble J.A., Erlich H.A. Genetics of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012. Vol. 2. №. 1. P. a007732. DOI: 10.1101/cshperspect.a007732.
9. Nguyen C., Varney M.D., Harrison L.C., Morahan G. Definition of high-risk type 1 diabetes HLA-DR and HLA-DQ types using only three single nucleotide polymorphisms. *Diabetes*. 2013. P. DB_121398. DOI: 10.2337/db12-1398.
10. Волькина А.П., Горшков И.П., Прилуцкая О.А. Генетические маркеры сахарного диабета (часть 1) // Успехи современной медицины. 2017. Т.2 №5. С.123-126.