

РАЗРАБОТКА ОРИГИНАЛЬНЫХ МЕТОДОВ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА HLA-DRB1 И ИНФОРМАТИВНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ПРИ РА: ПРИКЛАДНОЙ АСПЕКТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гусева И.А.1, Сорока Н.Е.2, Демидова Н.В.1, Лучихина Е.Л.1, Александрова Е.Н.1, Новиков А.А.1, Самаркина Е.Ю.1, Панасюк Е.Ю.1, Авдеева Е.А.1, Федоренко Е.В.1, Аронова Е.С.1, Лукина Г.В.1, Болдырева М.Н.3, Трофимов Д.Ю.2, Каратеев Д.Е.1, Насонов Е.Л.1.

1 - ФГБНУ «НИИР им.В.А.Насоновой», 2 - ЗАО «НПФ ДНК-Технология», 3 - ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА РФ

ВВЕДЕНИЕ/ЦЕЛЬ

К настоящему времени идентифицировано значительное число генов, вовлеченных в предрасположенность к развитию РА и формирование определенных клинических субтипов заболевания (рис.1). Также генетические маркеры могут служить предикторами эффективности и/или безопасности базисных противовоспалительных и генно-инженерных биологических препаратов.

Таким образом, к настоящему времени назрела необходимость оптимизации имеющихся методов ПЦР-генотипирования для использования их как в научных исследованиях, так и в «рутинной» лабораторной практике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 336 пациентов с РА (начало болезни 48,3±13,2 лет, длительность 6,7±5,1 лет), из них 123 пациента с длительностью симптомов до включения в исследование менее 2 лет (ранний РА, рРА), проспективно обследованных в течение 4 лет. Контрольную группу составили 303 здоровых доноров крови.

Используя методический подход «функциональный ген-кандидат» олиготипировали следующие полиморфизмы:

Полиморфизмы генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, их рецепторов и хемокинов.

TNF-A (-308 G/A)
IL-6 (-174G/C)
IL-6R (+358A/C)
IL-10 (-592A/C, -819T/C, -1082 A/G)
IL-1B (+3953C/T)
MCP-1 (+2581 A/G)

Полиморфизмы гена *MTHFR* (фолатный обмен)

MTHFR (+677C/T), (+2581A/G)

Гены из GWAS

HLA-DRB1 (аллели)
PTPN22 (+1858 A/C)
TNFAIP3 (rs675520, rs6920220, rs1049919)
CTLA4 (+49 A/G)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полимеразная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) в различных модификациях с использованием оригинальных сиквенс-специфических праймеров и проб, меченных различными флюоресцентными метками (НПФ «ДНК-Технология»), автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов проводились на отечественном инновационном детектирующем амплификаторе ДТ-96 (ООО «ДНК-Технология») (см.схему)

При проверке работоспособности созданных тест-систем в качестве референсного метода определения генотипа образцов использовали автоматическое секвенирование ДНК по Сэнгеру с применением автоматического секвенатора ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Кроме того была разработана и в настоящее время валидируется отечественная тест-система ПЦР-РВ для идентификации аллелей гена *HLA-DRB1* *0101/*0102, *0103, *03, *0401, *0402, *0404/*0405/*0408, *0403/*0407/*0411, *07, *08, *0901, *1001, *1101/*1104, *1102/*1103, *12, *15, *16, *1301/*1302/*1304/*1323, *1303, *1305/*1306/*1325, *1401/*1404, *1402), пригодная для «рутинного» использования. Время от момента выделения ДНК и получения конечного результата генотипирования составляет 2,5 -3 часа.

ВЫВОДЫ / ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования выявлен ряд полиморфизмов изученных генов, ассоциированных с предрасположенностью к развитию РА, клинико-лабораторными параметрами и эффективностью терапии ГИБП, которые могут быть использованы в практической медицине. Сравнение различных методов генотипирования аллелей гена *HLA-DRB1* и однонуклеотидных полиморфизмов позволило выбрать отечественные тест-системы и оборудование для использования в «рутинной» лабораторной практике в качестве оптимальных (в совокупности качество, стоимость, трудозатраты, минимальный риск контаминации).

Рис. 1 Гены, ассоциированные с РА (GWAS)

адаптировано из McAllister KM, 2011

