

Винахід відноситься до медицини, а саме, до ендокринології і може бути використаний для прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу ЦД 1.

Як прототип обраний спосіб прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу (Ш.У. Ахмедова, Д.А.Рахимова Поліморфізм генів HLA II класу у больных инсулинзависимым сахарным диабетом в узбекской популяции //Иммунология.- 2002.- №5.- С.298-300) шляхом виявлення схильності до цукрового діабету 1 типу, який оснований на молекулярному типуванні генів HLA II класу, аналізі розподілу аллелей DRB1, DQA1, DQB1 і встановленні генетичних маркерів схильності до ЦД 1.

Ознаками, що збігаються з основними ознаками запропонованого способу, є: виявлення генетичних маркерів схильності до ЦД 1.

Причинами, що перешкоджають досягненню очікуваного технічного результату (підвищення точності прогнозування), є: не забезпечує необхідної точності прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу, з тієї причини, що генетична схильність до ЦД 1 складається не тільки з аллелей DRB1, DQA1, DQB1, але поєднує цілий ряд діабет асоційованих локусів, відомо порядку 18 генів, розташованих на різних хромосомах;

крім того, даний метод не застосовується для масових профілактичних обстежень і вимагає дорогих реактивів.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу шляхом проведення додаткового дослідження генного маркера D6S2414 і виявлення відповідних аллельних варіантів, що використовуються як діагностичні критерії для прогнозування виникнення ЦД 1.

Поставлена задача досягається тим, що в спосіб прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу, що полягає у виявленні генетичних маркерів схильності до ЦД 1, відповідно до винаходу, досліджують поліморфізм генного маркера D6S2414 із хромосомною локалізацією 6p21.31, розташованого поблизу від генів HLA II класу та за наявності аллельних варіантів 8/12, 9/12, 10/11, 11/11, 12/13 становлять ризик розвитку ЦД 1.

Запропонований спосіб здійснюють у такий спосіб.

В обстежуваного з підозрою на схильність до захворювання ЦД 1 проводять забір венозної крові в кількості 3-5 мл. Виділення геномної ДНК проводять на ампліфікаторі Терцик MC-2 за допомогою фенол-хлороформного методу в 25мкл реакційної суміші, що містить 67мМ трис-НС1 буферного розчину, рН 8,3, 50мМ КС1, 1,5мМ MgCl₂, по 0,25мкМ кожного з dNTP, по 25нг праймерів D6S2414L 'AAOTGGGCTGAGATGTACCA-3' і D6S2414R - 5'AAACCACACCAATCTCTCTCC-3'. Полімеразна ланцюгова реакція проводиться по наступній програмі: 1 цикл - 9571 хвилина; 5 циклів -95720 секунд, 557 20 секунд, 727 20 секунд; 35 циклів - 95710 секунд, 55710 секунд, 72710 секунд. Продукти полімеразної ланцюгової реакції розділяють у 10% поліакриламідному гелі в 0,1М трисборатному буфері, рН 8,0 і забарвлюють сріблом.

Між сукупністю істотних ознак запропонованого способу та очікуваним технічним результатом, що може бути досягнутий, виявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: дослідження поліморфізму генного маркера D6S2414 із хромосомною локалізацією 6p21.31, розташованого поблизу від генів HLA II класу і виявлення аллельних варіантів 8/12, 9/12, 10/11, 11/11, 12/13 у результаті генотипування дозволяє використовувати їх як діагностичні маркери прогнозування розвитку ЦД 1 з наступним формуванням групи осіб з підвищеним ризиком розвитку захворювання в профілактичних цілях, а також верифікації преклінічного періоду з організацією превентивного лікування.

Відомості, що підтверджують можливість використання винаходу.

Всі обстежувані відносилися до трьох груп: діти, хворі на цукровий діабет 1 типу, батьки хворих дітей і контрольна група - група популяційного контролю. Першу групу склали хворі на цукровий діабет 1 типу - 35 осіб у віці від 1 року до 15 років, серед яких 18 хлопчиків і 17 дівчаток. В обстежувану групу увійшли діти, що проходили обстеження і лікування на базі ендокринологічного відділення. Групу батьків дітей, хворих на ЦД 1 склали 56 осіб, вік 22-45 років, з них 33 жінки і 23 чоловіка, без ознак ЦД 1. Групу контролю склали 50 донорів, у віці 19-56 років, з них 28 чоловіків і 22 жінки, у яких ЦД 1 також був відсутній.

При електрофорезі в 10% ПААГ у суміші після ампліфікації реєструвалися зони в області молекулярних мас 172 - 192 п.н. Виявлено 6 різних аллельних поліморфних варіантів у хворих на ЦД 1 і в їхніх батьків.

У таблиці 1 приведені порівняння частот аллелей локусу D6S2414 у контрольній групі - донори, у дітей з цукровим діабетом 1 типу та їхніх батьків

Аналіз розходжень частот аллелей між донорами і хворими на ЦД 1, між донорами і батьками хворих на ЦД 1, а також між батьками і хворими на ЦД 1 показує, що за критерієм χ^2 спостерігаються високодостовірні $p < 0,001$ розходження між донорами і хворими на ЦД 1 - $\chi^2 = 23,35$, а також між донорами і батьками хворих на ЦД 1 - $\chi^2 = 30,18$. По частотах окремих аллелей достовірні розходження - $p < 0,001$ спостерігаються по 13 аллелі, що частіше зустрічається в донорів у порівнянні з хворими на ЦД 1 та їхніми батьками - $\chi^2 = 13,86$ і $\chi^2 = 19,91$ відповідно.

Розходження частот аллелей між хворими на ЦД 1 та їхніми батьками незначні і недостовірні - $\chi^2 = 1,01$ при необхідному значенні χ^2 для відхилення нульової гіпотези = 3,8.

У таблиці 2 приведений порівняльний аналіз частот аллельних варіантів між хворими на ЦД 1 і донорами, між донорами і батьками хворих, і між хворими на ЦД 1 і їхніми батьками.

З отриманих даних випливає, що в хворих на ЦД 1, у порівнянні з донорами, вірогідно частіше зустрічаються аллельні варіанти 9/12, 10/11 і, гомозиготний варіант 11/11, що свідчить про позитивну асоціацію із ЦД 1 і дозволяє розглядати їх як маркери схильності до захворювання цукровим діабетом 1 типу. Навпроти, аллельні сполучення 12/12 і 11/13, частота яких у хворих на ЦД 1 у порівнянні з донорами вірогідно знижена, вказують на їхній протективний ефект і резистентність до ЦД 1. Відмінності між батьками хворих на ЦД 1 і донорами ще вище, ніж між самими хворими на ЦД 1 і донорами. По трьом аллельним сполученням 8/12, 10/11 і 11/11 їхня частота в батьків вище, ніж у донорів, а по чотирьом 9/11, 10/12, 11/13 і 12/12-нижче.

Порівняння частот аллельних варіантів між батьками і хворими на ЦД 1 показує, що достовірні розходження спостерігаються тільки для двох варіантів - 9/11 і 10/12. Тому що батьків, дітей хворих на ЦД 1 можна віднести до групи підвищеного ризику, те цього дані, відхилення по який спостерігаються тільки в батьків, можуть служити непрямым показником підвищеного ризику розвитку ЦД 1.

Виявлені в результаті генотипування маркери схильності до ЦД 1 дозволяють використовувати їх як прогностичні критерії ймовірності виникнення ЦД 1 і встановлення групи особи з підвищеним ризиком розвитку ЦД 1 для наступного моніторингу.

Застосування запропонованого способу дозволяє ідентифікувати в обстежуваного контингенту тільки - асоційовані зі ЦД 1 аллелі без детального аналізу повного HLA-генотипу.

Спосіб прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу, що заявляється, володіє достатньої інформативністю, має доступність у методичних і економічних відносинах, дозволяє рекомендувати його для впровадження в практику Пцр-лабораторій, а також використовувати в процесі медико-генетичного консультування осіб із спадковою обтяженістю по ЦД 1, родичів хворих на ЦД 1.

Таблиця 1

Спосіб прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу

Аллель		Порівняння частот аллелей		
№№	Довжина	Донори/ЦД 1	Донори/батьки	ЦД 1/батьки
8	172	0,0143	0,0268	0,0058
9	176	0,0052	0,0007	0,0026
10	180	0,0343	0,0365	0,0001
11	184	0,0046	0,0054	0,0001
12	188	0,0365	0,0333	0,0001
13	192	0,1386**	0,1991**	0,0015
Всього		0,2335***	0,3018***	0,0101

Примітки: достовірність відмінностей на рівні -
*-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001

Таблиця 2

Спосіб прогнозування виникнення цукрового діабету 1 типу

Аллельні сполучення		Частота аллельних сполучень		
№№ аллелей	Довжина аллелей	Донори/ЦД 1	Донори/батьки	Батьки/ЦД 1
/8	172/172	0	0,0007	0
8/9	172/176	0	0,0053	0
8/10	172/180	0	0,0124	0
8/11	172/184	0	0,0201	0
8/12	172/188	0,0286	0,0536*	0,0117
8/13	172/192	0	0,0019	0
9/9	176/176	0	0,0179	0,0179
9/10	176/180	0,0110	0,0007	0,0192
9/11	176/184	0,0147	0,0550*	0,1731***
9/12	176/188	0,0688**	0,0370	0,0029
9/13	176/192	0,0200	0,0200	0
10/10	180/180	0	0,0357	0,0357
10/11	180/184	0,0983**	0,0961**	0,0114
10/12	180/188	0,0020	0,1158***	0,1731***
10/13	180/192	0	0,0179	0,0179
11/11	184/184	0,0571*	0,0714**	0,0029
11/12	184/188	0,0170	0,0038	0,0058
11/13	184/192	0,1079**	1,1281***	0,0064
12/12	188/188	0,0800**	0,0800**	0
12/13	188/192	0,0001	0,0165	0,0128
13/13	192/192	0	0	0
Всього		0,5055***	1,7899***	0,4908***

Примітки: достовірність відмінностей на рівні *-p<0,05, ** - p<0,01, *** - p<0,001