

УДК 612.017:616-006.34:616-006.48:616-053

ГЕНЫ HLA II КЛАССА (ЛОКУС DRB I) И СОЛИДНЫЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ

**Арсамакова Х.Х., Козель Ю.Ю., Фадеева Т.В., Кудинова Э.Е., Златник Е.Ю.,
Кузнецов С.А.**

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России, (344037, г. Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63), e-mail onko-sekretar@mail.ru.

Проведено молекулярное типирование HLA II класса (локус DRB I) у 74 пациентов отделения детской онкологии РНИОИ с солидными злокачественными опухолями (саркома Юинга, остеогенная саркома, нейробластома, нефробластома, герминогенные опухоли – дисгерминома, тератома, тератобластома, эмбриональный рак яичка, семинома, герминогенная опухоль головного мозга), Исследование генов главного комплекса гистосовместимости HLA II класса проводилось на базе ГУЗ СПК РО, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). По результатам типирования главного комплекса гистосовместимости HLA II класса отмечено достоверное увеличение по сравнению с контролем только частоты DRB1 13 при нефробластоме ($\chi^2 - 4,45, p < 0,05$). Достоверное увеличение частоты специфичности HLA DRB1 13 при нефробластоме позволяет отнести этих детей в группу риска развития данной патологии.

Ключевые слова: дети, солидные злокачественные новообразования, главный комплекс гистосовместимости.

GENES HLA OF II CLASS (LOCUS DRB I) AND SOLID MALIGNANT TUMORS AT CHILDREN AND TEENAGERS

**Arsamakova H.H., Kozel Y.Y., Fadeeva T.V., Kudinova E.E., Zlatnik E.Y.,
Kuznetsov S.A.**

Federal State Budgetary Institution «Rostov Cancer Research Institute» Ministry of Public Health, (344037, Rostov – on – Don, 14 line, .63), e-mail onko-sekretar@mail.ru.

A molecular typing of HLA II class (locus DRB I) in 74 patients of pediatric oncology RNIIOI with solid malignant tumors (Ewing's sarcoma, osteosarcoma, neuroblastoma, nephroblastoma, germ cell tumors - dysgerminoma, teratoma, teratoblastoma, fetal testicular cancer, seminoma, the tumor germinogennaya brain), Study of major histocompatibility complex genes HLA II class was conducted on the basis of SECGOOSE FG, using polymerase chain reaction (PCR). According to the results of typing of major histocompatibility complex HLA II class showed a significant increase compared to control only the frequency of DRB1 13 with nephroblastoma ($\chi^2 - 4,45, p < 0.05$). Significant increase in the frequency specificity of HLA DRB1 13 with nephroblastoma can include these children at risk of developing this disease.

Key words: children, solid malignant neoplasms, main complex of histocompatibility.

Предрасположенность к целому ряду болезней генетически детерминирована («плохая наследственность»), а сама детерминированность часто связана с HLA-системой. Для значительной части населения – носителей определенных HLA-специфичностей существует «запрограммированный генетический риск» заболеть той или иной болезнью. Наиболее демонстративна в этом отношении группа ревматоидных заболеваний, которая находится в высокой положительной ассоциации с антигеном HLA-B27; до 90% больных

анкилозирующим спондилитом (болезнь Бехтерева), до 80% болезнью Рейтера являются носителем В27 [3].

Несмотря на то что изучение ассоциаций генетических маркеров системы HLA с заболеваниями продолжается уже более 20 лет, интерес к этой проблеме сохраняется. Это обусловлено, по меньшей мере, тремя обстоятельствами. Во-первых, еще далеко не исчерпан круг заболеваний, для которых можно предполагать существование ассоциаций с определенными HLA-антигенами на основании тех или иных теоретических и практических предпосылок. Во-вторых, лишь за немногим исключением остаются неясными механизмы уже найденных ассоциаций. В-третьих, многочисленные наблюдения свидетельствуют о том, что HLA-антигены могут быть ассоциированы не с заболеваниями как нозологической единицей, а лишь с его отдельными клиническими формами [7]. При некоторых заболеваниях найдено, что распределение HLA-антигенов у больных неодинаково в зависимости от сроков развития болезней, тяжести ее течения, наличия осложнений и т.п. [7].

Представления о строении системы HLA развивались и развиваются в течение всего периода ее изучения, однако за последние годы произошел качественный скачок в развитии этой проблемы. Раньше, когда основным объектом исследования могли служить только белки – антигены HLA, представления о комплексе генов HLA могли формироваться в основном на анализе косвенных данных, включающих изучение антигенов HLA в популяциях, в семейном анализе, реакциях, субстратах в которых были антигены HLA, и т.д. Теперь благодаря развитию молекулярной генетики и иммунохимии появилась возможность не только проводить тонкий анализ антигенов HLA, но и изучить сами гены HLA. Особенный прогресс в этом направлении произошел после открытия и внедрения в исследования в области изучения системы HLA метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющего анализировать необходимые для исследований участки ДНК, что в свою очередь открывало широкие возможности для быстрого и точного анализа молекулярного полиморфизма HLA [9].

Заболеваемость детей ЗН злокачественными новообразованиями в развитых странах медленно, но неуклонно растет, составляя 13–15 заболевших на 100 тысяч детского населения. Показатели смертности от злокачественных опухолей занимают 2-е место, уступая первенство смертности от травм и несчастных случаев [1].

В России ежегодно первично выявляется нефробластом около 600, нейробластом – 700, сарком мягких тканей и костей – по 770, ретинобластом и опухолей ЛОР органов – по 110, опухолей головного мозга – 1980, прочих опухолей – 220 [2].

В структуре детской онкологической патологии на долю солидных опухолей приходится до 35–40%. При этом около 2/3 детей и подростков поступают для первичного лечения с местно-распространенными и генерализованными процессами, т.е. в III–IV стадиях заболевания [5]. Это связано с рядом особенностей диагностики солидных опухолей у детей: прежде всего с невозможностью получить точные данные анамнеза заболевания и жалоб от маленького пациента, особенно это актуально для детей до 1 года. Второй причиной поздней диагностики является относительно малое количество визуально обнаруживаемых опухолей, к таковым следует отнести рабдомиосаркому влагалища и мягких тканей. Но даже в этих случаях клинические наблюдения [4] показывают, что при первичном поступлении диагноз установлен лишь в 6,6% случаев, что подтверждено и в других исследованиях [6].

Все это диктует необходимость разработки скринингового обследования детей для более раннего выявления злокачественных образований.

Целью данной работы было определение возможности использования генетического HLA-типирования детей и подростков с солидными злокачественными опухолями для прогнозирования риска развития патологического процесса и формирования на основе его результатов групп риска.

Материалы и методы исследования

Обследовано 74 пациента отделения детской онкологии РНИОИ: 12 пациентов с саркомой Юинга (9 мальчиков, 3 девочки); 11 пациентов с остеогенной саркомой (7 мальчиков, 4 девочки); 14 пациентов с нейробластомой (8 мальчиков, 6 девочек); 14 пациентов с нефробластомой (9 мальчиков, 5 девочек); 23 пациента с герминогенными опухолями (10 мальчиков, 13 девочек). Средний возраст больных составил: с саркомой Юинга – 11,8 года, остеогенной саркомой – 17,1 года, нейробластомой – 4,7 года, нефробластомой – 4,8 года, герминогенными опухолями – 14,2 года. Заболевание начиналось в среднем в возрасте: с саркомой Юинга – 11,6 года, остеогенной саркомой – 16,4 года, нейробластомой – 4,4 года, нефробластомой – 4,2 года, герминогенными опухолями – 10,6 года.

Контрольную группу составили 128 доноров ГУЗ «СПК» РО.

Молекулярное типирование HLA-гена DRB1 проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью наборов реагентов «НПФ ДНК – Технология» (Москва), позволяющей выявлять 13 групп аллелей HLA–DRB1 (базовое разрешение). Геномная ДНК выделялась из мононуклеарных клеток периферической крови (свежей или замороженной

при температуре -20 °С), стабилизированной ЭДТА, с помощью набора реагентов для выделения ДНК «НПФ ДНК – Технология» (Москва). Все этапы амплификации проводились на амплификаторе «ТЕРЦИК» («НПФ ДНК – Технология», Москва). Продукт, полученный в ходе амплификации, определяли методом горизонтального электрофореза в 3%-ном агарозном геле. Специфичность продукта амплификации на всех этапах исследования оценивали в соотношении со стандартным маркером ДНК (PUC – 19).

Статистический анализ результатов включал изучение частоты встречаемости HLA-специфичностей, показателей относительного риска развития заболевания (RR). Для оценки различий в группах сравнения использовали критерий χ^2 , [8] величина «р», соответствует вычисленному значению χ^2 .

Результаты исследования

Данные о частоте встречаемости генов HLA II класса (локус DRB I) среди больных детей с солидными злокачественными опухолями и группы популяционного контроля представлены в таблицах 1–5.

Таблица 1 – Сравнительная таблица распределения генов HLA II класса (локус DRB I) у детей с саркомой Юинга

HLA II класса (DRB1)	Здоровые лица (n = 128)	Больные (n = 12)	χ^2
01	25,00	25,0	0,04
03	22,65	8,33	0,54
04	18,75	16,67	0,04
07	14,06	8,33	0,03
08	7,81	8,33	0,004
09	6,25	8,33	0,11
10	3,90	-	-
11	17,97	8,33	0,26
12	7,81	-	-
13	29,68	33,33	0,004
14	3,90	16,67	1,56
15	21,88	33,33	0,57
16	10,94	8,33	0,45

В таблице 1 – частота встречаемости антигена (в %).

При анализе результатов типирования с саркомой Юинга (таблица 1) отмечается повышение частоты специфичностей DRB1 14 (в группе составила 16,67%, в контроле – 3,9%), DRB1 15 (33,33 и 21,85% соответственно). Число гомозигот при саркоме Юинга – 2 наблюдения.

Таблица 2 – Сравнительная таблица распределения генов HLA II класса (локус DRB I) у детей с остеогенной саркомой

HLA II класса (DRB1)	Здоровые лица (n = 128)	Больные (n = 11)	χ^2
01	25,00	18,18	0,02
03	22,65	45,45	1,75
04	18,75	18,18	0,1
07	14,06	-	-
08	7,81	-	-
09	6,25	27,27	3,6
10	3,90	-	-
11	17,97	9,09	0,09
12	7,81	9,09	0,07
13	29,68	18,18	0,21
14	3,90	-	-
15	21,88	18,18	0,21
16	10,94	-	-

В таблице 2 – частота встречаемости антигена (в %).

У больных с остеогенной саркомой (таблица 2) повышена частота DRB1 03 – 45,45% (контроль – 22,65%) и DRB1 09 – 27,27% (контроль – 6,25%). Число гомозигот при остеогенной саркоме – 5 наблюдений. Достоверного повышения частоты специфичностей DRB1 – гена у больных с саркомой Юинга и остеогенной саркомой не выявлено. В обеих группах отсутствует специфичность DRB1 – 10, вероятнее всего, вследствие небольшого числа пациентов в данных группах.

Таблица 3 – Сравнительная таблица распределения генов HLA II класса (локус DRB I) у детей с нейробластомой

HLA II класса (DRB1)	Здоровые лица (n = 128)	Больные (n = 14)	χ^2
-----------------------------	--------------------------------	-------------------------	----------------------------

01	25,00	28,57	0,001
03	22,65	21,42	0,05
04	18,75	35,71	1,31
07	14,06	14,28	0,05
08	7,81	-	-
09	6,25	14,28	0,32
10	3,90	7,14	0,02
11	17,97	7,14	0,42
12	7,81	14,28	0,45
13	29,68	14,28	0,82
14	3,90	7,14	0,44
15	21,88	7,14	0,9
16	10,94	7,14	0,001

В таблице 3 – частота встречаемости антигена (в %).

При нейробластоме (таблица 3) частота HLA DRB1 04 – 35,71% (контроль – 18,75%), DRB1 09 – 14,28% (контроль – 6,25%), DRB1 12 – 14,28% (контроль – 7,81%), DRB1 14 – 7,14% (контроль – 3,9%). Число гомозигот при нейробластоме – 3 наблюдения.

Таблица 4 – Сравнительная таблица распределения генов HLA II класса (локус DRB I) у детей с нефробластомой

HLA II класса (DRB1)	Здоровые лица (n = 128)	Больные (n = 14)	χ^2
01	25,00	7,14	1,37
03	22,65	28,57	0,03
04	18,75	35,71	1,31
07	14,06	7,14	0,09
08	7,81	7,14	0,38
09	6,25	-	-
10	3,90	-	-
11	17,97	7,14	0,42
12	7,81	14,28	0,10
13	29,68	57,14	4,45
14	3,90	-	-
15	21,88	7,14	0,90

16	10,94	7,14	0,0003
----	-------	------	--------

В таблице 4 – частота встречаемости антигена (в %).

При нефробластоме (таблица 4) отмечено повышение частоты DRB1 04 – 35,71% (контроль – 18,75%) и достоверно повышена частота DRB1 13 – 57,14% (χ^2 – 4,45, $p < 0,05$). Число гомозигот при нефробластоме – 3 наблюдения.

Таблица 5 – Сравнительная таблица распределения генов HLA II класса (локус DRB1) у детей с герминогенными опухолями

HLA II класса (DRB1)	Здоровые лица (n = 128)	Больные (n = 23)	χ^2
01	25,00	10,0	1,01
03	22,65	20,0	0,29
04	18,75	20,0	0,09
07	14,06	10,0	0,57
08	7,81	20,0	0,46
11	17,97	10,0	0,04
12	7,81	10,0	0,01
13	29,68	40,0	0,09
15	21,88	30,0	0,03

В таблице 5 – частота встречаемости антигена в (%).

У больных с герминогенными опухолями (таблица 5) повышена частота DRB1 08 – 20,0% (контроль – 7,8%), DRB1 13 – 40,0% (контроль – 29,68%), DRB1 15 – 30,0% (контроль – 21,88%). Число гомозигот при герминогенных опухолях – 3 случая.

Выводы

1. Проведение молекулярного типирования генов HLA II класса выявило повышение частоты специфичностей: DRB1 14, DRB1 15 при саркоме Юинга, DRB1 03 и DRB1 09 при остеогенной саркоме, DRB1 04, DRB1 09, DRB1 12, DRB1 14 при нейробластоме, DRB1 04 и DRB1 13 при нефробластоме, DRB1 08, DRB1 13, DRB1 15 при герминогенных опухолях. **Статистически достоверно по сравнению с контролем повышена только частота DRB1 13 при нефробластоме (χ^2 – 4,45, $p < 0,05$).**

2. Достоверное увеличение частоты специфичности HLA DRB1 13 при нефробластоме позволяет отнести этих детей в группу риска развития данной патологии.

Список литературы

1. Аксель Е.М. Злокачественные новообразования у детей : мат. II съезда детских онкологов и гематологов. России. 4-6 июля Ростов-на-Дону // Детская онкология. – 2001. – С. 22.
2. Двойрин В.В., Аксель Е.М. Заболеваемость злокачественными новообразованиями населения России в 1990 году // Вопр. онкологии. – 1992. – Т. 38. – № 12. – С. 1413–1483.
3. Зарецкая Ю.М., Леднев Ю.А. HLA 50 лет: 1958–2008. – Тверь, 2008. – С. 36–37.
4. Кныш И.Г., Терновский К.С., Борисюк И.Б. Синовиальная саркома. – Киев, 1975. – С. 43–44.
5. Моисеенко Е.И., Современная функциональная модель отделения амбул. // Детская онкология. – 1995. – № 2–3. – С. 5–11.
6. Ниньо-Кастельянос Х.Э., Горзов П.П. и др. Саркомы мягких тканей и их диагностика : тез. Межгос. симп. «Опухоли мягких тканей». – Ярославль, 1992. – С. 28–30.
7. Певницкий Л.А. Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // Вестник АМН СССР. – 1988. – № 7. – С. 48–51.
8. Svejgaard A., Ryder L. HLA and disease associations: Detecting the strongest association // Tissue Antigens. – 1994. – № 43. – P. 18–27.
9. Middleton D., Williams F. HLA 1997 / Eds P. Terasaki, D. Gjertson. – 1998.

Рецензент-

Каймакчи О.Ю., д.м.н., ассистент кафедры онкологии Ростовского государственного медицинского университета, г. Ростов-на-Дону.