

УДК 616-006.448

## ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ HLA-МАРКЕРЫ I и II КЛАССОВ У БОЛЬНЫХ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Баратова Д.А.<sup>1</sup>, Баратова М.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НМУ "Евразийский центр онкогематологии, иммунологии и терапии" Санкт-Петербург, Россия. (195197, Санкт-Петербург, проспект Полюстровский, д. 59 литер Ш), e-mail: baratova@list.ru

<sup>2</sup>АО «Республиканский научный центр неотложной медицинской помощи» Астана, Казахстан. (010000, Астана, улица Керей-Жанибек хандар д.3), e-mail: maksat-brt@list.ru

В статье представлены результаты исследований иммуногенетических характеристик по системе HLA-аллелей I и II классов больных множественной миеломой киргизской национальности в сравнении с антигенами HLA-аллелей I и II классов больных множественной миеломой жителей Северо-западного региона Российской Федерации. Поскольку HLA-антигены отличаются у этнических групп и национальностей, данная работа проводится впервые и выявлены комплексными лабораторными методами значимые HLA- маркеры у больных множественной миеломой киргизской нации. При сопоставлении генов HLA – локусов (A и B) и HLA – локуса DRB1\* результаты анализов показали, характерные для больных множественной миеломой киргизской национальности антигены в локусе HLA- (A и B)- HLA-A28, HLA-B13, HLA- B17 и реже встречаются антигены HLA- A24, HLA-A25, HLA- B35 и в локусе HLA–локуса DRB1\*, HLA-DRB1\*0901, HLA-DRB1\*1001, HLA-DRB1\* 1601 и реже встречается HLA -DRB1\* 1401, и имеются достаточно статистически достоверные отличия. Таким образом, выявленные различия в сопоставлении с контрольной популяционной группой позволит своевременно выбрать лечения и подобрать донора костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: HLA, множественная миелома, киргизская нация.

## IMMUNOGENETIC MARKERS HLA-CLASS I AND II IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

Baratova D.A.<sup>1</sup>, Baratova M.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> NMU "Eurasian Center oncohematology, immunology and therapy" Saint Petersburg, Russia (195197, St. Petersburg, prospect Polyustrovsky 59, literU), e-mail: baratova@list.ru

<sup>2</sup> AO "Republican Scientific Center of Emergency Medical Assistance" Astana, Kazakhstan (010000, Astana, street-Kerey-Janibek handar, 3), e-mail: maksat-brt@list.ru

The article presents the results of studies on the immunogenetic characteristics of the system alleles HLA- class I and II patients with multiple myeloma kirghiz ethnic group compared with the antigens HLA- alleles of class I and II patients with multiple myeloma in the Northwestern region of the Russian Federation. Complex laboratory methods revealed significant HLA- markers in patients with multiple myeloma kirghiz nation. When comparing the gene HLA -locus (A and B) and HLA - DRB1 \* locus test results showed typical for patients with multiple myeloma kirghiz ethnic locus antigens HLA-(A and B ) -HLA- A28 , HLA- B13 , HLA- B17 and rarer antigens HLA- A24 , HLA- A25 , HLA- B35 and the locus HLA - locus DRB1 \*, HLA-DRB1 \* 0901 , HLA-DRB1 \* 1001 , HLA-DRB1 \* 1601 and less common HLA-DRB1 \* 1401 and there are quite statistically significant differences. Thus, the observed differences in comparison with the control group population will allow for the timely selection of treatment and choice of donor bone marrow or hematopoietic stem cells.

Keywords: HLA, multiple myeloma, kirghiz nationality.

### Введение

В настоящее время проблема заболеваемости множественной миеломой продолжает оставаться весьма актуальной и современной.

Множественная миелома (ММ) встречается в различных странах среди представителей разных рас и считается как «болезнь пожилого возраста». Средний возраст больных составляет 68 лет, однако, в последние годы отмечается тенденция к омоложению заболевания. Множественная миелома чаще распознается на поздних сроках, так как отсутствуют маркеры злокачественного заболевания, особенно на раннем этапе её развития.

Возникновение и развитие ММ – это сложный процесс, обусловленный сочетанным воздействием многообразных внешних и внутренних факторов. Изучение диагностического значения и роли системы «human leucocyte antigens» (HLA) при гемобластозах и лимфопролиферативных заболеваниях имеет достаточно длинную историю, но полученные ранее данные в распределении антигенов HLA-аллелей у больных с онкогематологической патологией весьма скудны и противоречивы.

В настоящее время практически отсутствуют работы, направленные на изучения генного полиморфизма HLA-генов локусов (A и B) и локуса DRB1\* среди этнических групп и национальностей с множественной миеломой. Одни исследователи отмечают увеличение частоты следующих антигенов в группе больных с множественной миеломой среди смешанной популяции народов СССР–A28, B27[5],HLA-A11,HLA-B7 [2].

В работе [3] автор показал, что у больных ММ жителей Северо-западного региона Российской Федерации, антиген HLA-B7 является генетическим маркером ММ с низкой пролиферативной активностью у женщин и ассоциирован с дисрегуляцией в системе ИЛ-6, а антиген HLA-A11- характеризует ММ с изолированной продукцией легких цепей иммуноглобулина у мужчин.

Автором работы [4] обнаружены и охарактеризованы информативные признаки для каждого иммунохимического варианта миеломы, предрасполагающие HLA-специфичности: AI9 и B16 – для миеломы с секрецией Ig G; для варианта Ig A является HLA-A3, для Бенс-Джонса A10, B18, DRB1\*09 и DQB 1\*303. К заболеванию миеломой в молодом возрасте предрасполагает HLA-A28.

Авторами в работе Smith G. и соавт [6] выявлена повышенная встречаемость частоты антигенов HLA-A9 у белокожих жителей США, страдающих множественной миеломой с продукцией Ig A.

Все указанные работы проводились в популяциях разной национальной принадлежности (по смешанному населению).

Данные литературы о наличии ассоциаций между антигенами главного комплекса гистосовместимости и множественной миеломой, крайне противоречивы. Это может быть

связано со сложившимся ранее представлением о том, что множественная миелома не является заболеванием, ассоциированным с какими-либо генами или антигенами системы HLA, а также из-за малоизученности этого заболевания среди этнических групп, национальностей, а также с техническими трудностями и высокой стоимостью проведения методов исследования.

Однако для сопоставления данных результатов нас привело использовать результаты данной работы [3], посвященной исследованиям больных с множественной миеломой, проживающих в одной географической местности Северо-западного региона РФ и провести собственное исследование антигенов главного комплекса гистосовместимости HLA–аллелей локуса DRB1\* у больных множественной миеломой киргизской национальности.

**Целью** нашего исследования является изучение иммуногенетических характеристик в распределении по системе HLA-аллелей I и II классов у больных с множественной миеломой киргизской национальности.

#### **Материалы и методы исследования**

Общее количество больных множественной миеломой – 44 человек, наблюдавшиеся в Национальном госпитале МЗ Киргизской Республики, Евразийском центре онкогематологии, иммунологии и терапии, граждане Киргизской Республики, из них 22 больных киргизской национальности, типированные для изучения иммунологических и популяционных характеристик по системе HLA-аллелей II класса локуса DRB1\* с 1996 года по 1998 год в лаборатории иммунологии Санкт-Петербургской клинической больницы № 31 и 2-ое больные типированы с 2006 по 2012 год в лаборатории «ИнтерМед». Больные разной стадией течения заболевания и возраст больных от 33 до 90 лет.

Данные результаты сопоставлялись с контрольной группой – 20-ю больными множественной миеломой киргизской национальности, типированные по системе-HLA – аллелей I класса локусов (A и B) в лаборатории иммунологии Санкт-Петербургской клинической больницы № 31 (Клинический центр передовых медицинских технологий) [1] и 98 больными множественной миеломой жителей Северо-западного региона Российской Федерации [3].

#### **Типирование HLA- антигенов I-класса**

Определение HLA-A и B фенотипа обследуемых лиц проводили серологическим методом с использованием панели гистотипирующих антилейкоцитарных сывороток Российского НИИ гематологии и трансфузиологии, позволяющих определить 17 антигенов локуса A и 27 антигенов локуса B.

#### **Типирование HLA-антигенов II-класса**

Молекулярное типирование HLA- генов локуса DRB1 проводилось методом полимеразной цепной реакцией, с использованием набора отечественных праймеров фирмы «ДНК-технология» (Москва), позволяющего выделять 13 групп аллелей HLA-DRB\*1(базовое разрешение). Геномная ДНК выделялась из мононуклеарных клеток периферической крови (свежей или замороженной при -20 °С), стабилизированной ЭДТА или цитратом натрия (конечная концентрация антикоагулянта 0,5 %), с помощью набора реагентов «НПФ ДНК-Технология» Москва или иммуномагнитным методом с использованием набора фирмы «Dyna!».

Все этапы амплификации проводились на амплификаторе «ТЕРЦИК» «ДНК-Технология», Москва). Продукт, полученный в ходе амплификации, определяли методом горизонтального электрофореза в 3,2 % агарном геле с визуализацией в ультрафиолетовом свете  $L=320$  nm. Специфичность продукта амплификации сравнивали со стандартным маркером длин ДНК PUC-09.

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя анализ стандартных критериев.  $\chi^2$ -квадрат, использовался для оценки достоверности различий по встречаемости определенных признаков между контрольной группой и группой пациентов ММ. Определение величины "p", соответствующей найденному значению.  $\chi^2$ -квадрат, проводили с учетом одной степени свободы.

Все математические расчеты и общий статистический анализ полученных исследований проводили с помощью персонального компьютера с использованием пакета прикладных программ для Электронных Таблиц – "Microsoft - Excel<sup>M</sup>" Версия 7,0 для Windows 95, для Windows-2010, Statistica-5.

### **Результаты и их обсуждения**

Проведённые нами исследования среди больных с множественной миеломой киргизской национальности по изучению главного комплекса гистосовместимости по системе HLA-аллелей I–II классов, показал, что в результатах анализов частоты встречаемости имеются наиболее распространенные и весьма различающиеся ряда генов в сопоставлении с больными множественной миеломой жителей Северо-западного региона Российской Федерации [3].

Таблица 1

Частота встречаемости HLA-аллелей I класса больных множественной миеломой киргизской национальности и жителей Северо-западного региона Российской Федерации.

HLA локусы (A и B)	Больные множественной миеломой Северо-западного региона РФ n=98	Больные множественной миеломой киргизской национальности n=22
--------------------------	--	--

A24	30% p < 0,05	10%
A 25	42,4% p < 0,05	20%
A28	8,1%	20% p < 0,05
B13	6,9%	30% p < 0,001
B17	7,6%	20% p < 0,05
B35	23,3% p < 0,05	10%

По результатам нашего исследования (табл. 1) при сравнительном анализе частоты встречаемости HLA-аллелей в локусах (AиB), чаще встречаются антигены HLA-A28, HLA-B13, HLA-B17 и реже встречаются антигены HLA-A24, HLA-A 25, HLA-B35 у больных множественной миеломой киргизской национальности по сравнению с больными множественной миеломой Северо-западного региона Российской Федерации и имеют высоко статистически достоверные различия.

Таблица 2

Сопоставление HLA-антигенов II класса локуса DRB1\* больных множественной миеломой киргизской национальности и жителей Северо-западного региона Российской Федерации.

HLA-локус DRB1*	множественная миелома у больных жителей Северо-западного региона РФ n=98	множественная миелома у больных киргизской национальности n=22
0901	1,6%	20% p < 0,003
1001	0,8%	10% p < 0,04
1401	21,3%	20% p < 0,04
1601	2,4%	20% p < 0,005

При сопоставлении результатов анализа по распределению антигенов HLA-аллелей локуса DRB1\*II класса больных множественной миеломой киргизской национальности и больных множественной миеломой Северо-западного региона Российской Федерации (табл. 2), показано, что чаще выявляются у больных ММ киргизской национальности гены HLA-DRB1\*0901, HLA-DRB1\*1001, HLA-DRB1\*1601 и несколько реже встречается ген HLA-DRB1\*1401.

По значимости отличий встречаемости между больными множественной миеломой киргизской национальности и контролем является ген HLA-DRB1\* 1601, что достаточно статистически достоверно p<0,005.

### Заключение

Таким образом, по результатам проведенных исследований в распределении HLA-аллелей I и II классов у больных ММ, показало, что наиболее характерные для больных множественной миеломой киргизской национальности в распределении HLA-аллелей I класса гены в локусе А - HLA-A 28, в локусе В – HLA-B13, В17, а в локусе HLA-DRB1\* II класса, оказалось, что у больных множественной миеломой киргизской национальности, чаще выявляются гены HLA-DRB1\*0901, HLA- DRB1\*1001, HLA-DRB1\* 1601 и несколько реже HLA-DRB1\*1401.

Выявленные различия в распределении HLA-аллелей следует учитывать при планировании близкородственной и неродственной трансплантации костного мозга, у больных множественной миеломой и при других онкогематологических злокачественных заболеваниях.

### Список литературы

1. Баратова Д.А. Сравнительная характеристика распределения HLA-аллелей I и II классов у больных множественной миеломой и здоровых лиц киргизской национальности и жителей Северо-западного региона Российской Федерации: автореф. дис... канд. мед. наук. – С.-Петербург, 2000. – С. 10-11.
2. Голенков А., Назарова И., Петроченков А., Серова Л., Сибирякова Л. Распределение HLA-антигенов класса I у пациентов с множественной миеломой // Гематология и трансфузиология. – 1993. – Т. 2, № 38. – С.10-12.
3. Петроченков А.Н. Антигены главного комплекса гистосовместимости у больных с различными клиническими вариантами множественной миеломы: автореф. дис... д-ра мед. наук. – С.-Петербург, 1994. – С. 4-5.
4. Сенькина Е. А. Клиническое значение полиморфизма HLA-специфичностей классов I, II и иммунных нарушений при множественной миеломе: автореф. дис... канд. мед. наук. – С.-Петербург, 2010. – С. 9-11.
5. Тананов А.Т. Лейкоцитарные антигены (HLA) человека и болезни // Проблемы гематологии и переливания крови. – 1978. – Т.21, № 3. – С.45-49.
6. Smith G., Walford R.L., Fishkin B. et al. Tissue Antigens. – 1974. – Vol. 4, № 4. – P.374-377.

### Рецензенты:

Козина Л.С., д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник Санкт-Петербургского института биорегуляции и геронтологии, г. Санкт-Петербург.

Краева Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург.