

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Баратова Д.А.¹⁻⁴, Баратова М.А.², Джaparкулова А.Д.^{3,4}

¹НМУ «Евразийский центр онкогематологии, иммунологии и терапии», Санкт-Петербург, Россия (195197, Санкт-Петербург, проспект Полюстровский, д. 59, литер Ц), e-mail: baratova@list.ru

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

³ГУ «Национальный госпиталь при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики», Бишкек, Кыргызская Республика (720040, Бишкек, улица Тоголок Молдо, 1), e-mail: dzhaparkulova@list.ru

⁴МОО «Национальный Регистр гемопоэтических стволовых клеток Киргизии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, Россия. (195197, Санкт-Петербург, проспект Полюстровский, д. 59, литер Ц)

В статье представлены клинико-диагностические исследования иммунохимических вариантов иммуноглобулинов, выявленные с помощью моноклональных антител. Выявленные типы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови являются одним из основных диагностических критериев при заболевании множественной миеломой (ММ). У больных ММ киргизской национальности чаще выявляется Ig A-миелома (в 68 % случаев), Ig D-миелома (в 100 % случаев), биклональная (Ig A, Ig E)-миелома (в 100 %) и Ig G -миелома (в 31% случаях). При сравнительной оценке по частоте встречаемости иммуноглобулинов с легкими цепями у больных множественной миеломой киргизской национальности встречаются вариант IgAk-цепи (в 95 % случаях), Ig Gk-цепи (в 80 % случаях), IgGλ-цепи (в 85 % случаях). У потенциальных доноров костного мозга киргизской национальности в сыворотке крови выявляются IgAk-цепи (в 5 % случаях), IgGk-цепи (в 20 % случаях), IgGλ-цепи (в 15 % случаях) и практически в 100 % встречается IgAλ-цепи. Данные результаты необходимо учитывать при планировании аутооттрансплантации гемопоэтических стволовых клеток при множественной миеломе и при других злокачественных онкогематологических заболеваниях.

Ключевые слова: иммуноглобулины, легкие κλ-цепи, множественная миелома, киргизская нация.

CLINICAL DIAGNOSTIC STUDIES IMMUNOCHEMICAL VARIANT IMMUNOGLOBULINS ARE USING MONOCLONAL ANTIBODIES IN PATIENTS MULTIPLE MYELOMA AND POTENTIAL DONORS HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Baratova D.A.¹⁻⁴, Baratova M.A.², Dzhaparkulova A.D.^{3,4}

¹"Eurasian Center oncohematology, immunology and therapy" Saint Petersburg, Russia (195197, St. Petersburg, prospect Polyustrovsky 59, liter U), e-mail: baratova@list.ru

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

³"National Hospital under the Ministry of Health of the Kirghiz Republic" Bishkek, Kirghiz Republic (720040, Bishkek, street Togolok Moldo1), e-mail: dzhaparkulova@list.ru

⁴"National Register of hematopoietic stem cells Kirghizia in Saint Petersburg" Saint Petersburg, Russia (195197, St. Petersburg, prospect Polyustrovsky 59, liter U)

The paper presents laboratory and diagnostic indicators paraprotein identified using monoclonal antibodies. Identified monoclonal paraprotein in serum is one of the main diagnostic criteria for the disease of multiple myeloma (MM). Patients MM kirghiz ethnic often detected Ig A-myeloma (in 68 % of cases), Ig D-myeloma (in 100 % of cases), biklonalnaya (Ig A, Ig E)-myeloma (100 %) and Ig G- myeloma (31 % of cases). In comparative evaluation of the frequency of occurrence of immunoglobulin light chains in patients with multiple myeloma kirghiz ethnic variant found IgAk-chain (95 % of cases), IgGk-chain (80 % of cases), IgGλ -chain (85 % of cases). Do potential bone marrow donors kirghiz ethnic serum revealed IgAk-chain (5 % of cases), IgGk-chain (20

% of cases), IgG λ - chain (15 % of cases) and almost 100 % meets IgA λ -chain. These results should be considered when planning autologous hematopoietic stem cells in multiple myeloma and other hematologic malignancies.

Keywords: immunoglobulin, light λ , κ -chain, multiple myeloma, kirghiz nation.

Множественная миелома (ММ) – β -клеточное лимфопролиферативное заболевание, основным морфологическим субстратом которого являются клональные плазматические клетки, продуцирующие моноклональные иммуноглобулины (Ig A, IgM, IgG, Ig D, IgE) и ($\kappa\lambda$) легкие цепи.

Согласно иммунохимической классификации выделяют варианты ММ: IgA, IgM, IgG, IgD, IgE, болезнь легких цепей (миелома Бенс-Джонса), диклоновые миеломы и несекретирующая миелома [1].

Общеизвестно, что парапротеинемии обычно сопровождаются выраженным снижением продукции нормальных иммуноглобулинов и повышенной восприимчивости к инфекциям.

Моноклональная секреция обуславливает такие проявления заболевания, как синдром повышенной вязкости крови и хроническая почечная недостаточность.

При ММ считаются достоверными классическими диагностическими признаками: наличие плазматических клеток в костномозговом пунктате более 10 %, остеолитические деструктивные изменения в костной ткани и парапротеинемии и /или протеинурии Бенс-Джонса [5;6].

По данным исследователей наиболее часто встречающиеся ММ: Ig G (>65 % случаев), Ig A (20-26 % случаев), Ig D и Ig M (1 % и 0,5 % случаев соответственно). Белок Бенс-Джонса (легкие цепи иммуноглобулинов чаще κ -цепи) выявляется у 10 % больных, страдающих ММ [3].

Класс и тип секретируемых миеломными клетками иммуноглобулинов определяет иммунохимический вариант заболевания.

Целью нашего исследования явилось определение изотипов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов с помощью моноклональных антител в сыворотке крови у больных множественной миеломой и потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности.

Материалы и методы исследования

Больные ММ в количестве 108 человек типированы в лаборатории иммунологии на иммуноглобулины IgA, IgM, IgG, IgD, IgE (22 больных киргизской национальности и 86 больных русскоязычного населения Киргизии). Больные наблюдались в Национальном госпитале МЗ Киргизской Республики (граждане Киргизской Республики). Больные разных стадий течения заболевания [2] и в возрасте от 33–90 лет. Из них 44 больных (20 больных киргизской национальности и 24 больных из русскоязычного населения Киргизии) с сентября 1995 года по ноябрь 1999 года исследованы на парапротеины с помощью моноклональных антител в

лаборатории гибридной технологии ЦНИРРИ (г. Санкт-Петербург). С 2005 г. по 2013 г. исследован материал от 78 добровольных потенциальных доноров костного мозга киргизской национальности в возрасте от 18–45 лет, (женщин – 25, мужчин – 53) из Национального Регистра гемопоэтических стволовых клеток Киргизии в Санкт-Петербурге, а также от 7 больных ММ (2 больных киргизской национальности и 5 больных русскоязычного населения Киргизии) исследованы в Санкт-Петербургском НИИЭиМ имени Пастера, Национальном госпитале МЗ Киргизской Республики, Евразийском центре онкогематологии, иммунологии и терапии, на содержание изотипов тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов с помощью моноклональных антител типированы в лаборатории гибридной технологии ЦНИРРИ ФАЗСР и в лаборатории «ИнтерМед».

Диагноз ММ устанавливали на основании стандартных критериев, включающих классическую триаду: плазмцитоз костного мозга не менее 10 %, костные повреждения различной степени – от остеопороза до остеолитического, моноклональный белок в крови и/или моче. У каждого больного учитывались клинические и лабораторные показатели, стадия заболевания, возраст, пол с последующей их прогностической значимостью. Определены иммунологические варианты [1] продукции иммуноглобулинов типов тяжелых и легких цепей. Больные ММ типированы в лаборатории иммунологии КНИИК на иммуноглобулины Ig A, Ig M, IgG, IgD, IgE – всего 108 больных. Из них 22 больных ММ киргизской национальности типированы с помощью моноклональных антител в лаборатории гибридной технологии. При этом выявлены иммуноглобулины IgG1κ-цепи в I-ой стадии у 1-го больного, во II-ой стадии у 1-ой больной и в III-ей стадии у 1-го больного, IgG1λ-цепи во II-ой стадии у 1-ой больной и в III-ей стадии у 1-ой- больной, IgG2κ-цепи во II-ой стадии у 1-го больного, IgG2λ-цепи во II-ой стадии у 1-го больного и в III-ей стадии у 1-ой больной, Ig A κ-цепи в I-ой стадии у 1-го больного, во II-ой стадии у 6-х больных и в III-ей стадии у 3-х больных. Дополнительно 4-х больных исследовали на иммуноглобулин Ig D и Ig E. При этом выявлено в I-ой стадии у 1-го больного Ig Dλ-цепи, во II стадии у 2-х больных -Ig Dλ-цепи и во II-ой стадии у 1-го больного (биклональная опухоль Ig Aκ и Ig Eκ-цепи).

Типированы в лаборатории иммунологии КНИИК на иммунохимический вариант иммуноглобулинов 86 больных ММ русскоязычного населения Киргизии, из них у 29 больных определены парапротеины с помощью моноклональных антител в лаборатории гибридной технологии ЦНИРРИ ФАЗСР и выявлены иммуноглобулины. IgG1κ-цепи в I-ой стадии у 1-ой больной, во II стадии – у 2-х больных и в III стадии у 2-х больных, Ig G1λ-цепи в I-ой стадии у 1-

ой больной, во II стадии – у 2-х больных и в III стадии у 1-го больного, Ig G2 λ -цепи во II стадии – у 2-х больных и в III стадии у 1-го больного и Ig G2 κ - цепи во II стадии – у 2-х больных и в III стадии у 3-х больных, иммуноглобулин Ig Ak-цепи – в I-ой стадии у 1-ой больной, во II стадии – у 1-ой больной и в III стадии у 3-х больных, Ig E – в I-ой стадии у 1-ой больной и Ig M – у 3-х больных в III стадии, нет M-пика у 1-ой больной в I-ой стадии и у 1-ой больной в III-ей стадии.

Из 78 добровольных потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности, которые себя считали практически здоровыми людьми, с профилактической целью исследованы на содержание свободных цепей иммуноглобулинов с помощью моноклональных антител и выявлены у 4-х доноров мужчин в возрасте от 29–45 лет повышенные уровни иммуноглобулинов IgAk -цепи у 1-го донора, IgG κ -цепи – у 1-го донора, IgA λ -цепи у 1-го донора и IgG λ -цепи у 1-го донора.

Доставка и транспортировка анализов проводилось в минихолодильных контейнерах при -10 °С.

Все моноклональные антитела (МкАТ) получены и описаны в лаборатории гибридомной технологии ФГУ ЦНИРРИ ФАЗСР, г.Санкт- Петербурга.

Типирование иммуноглобулинов: выполнено методом прямого твердофазного иммуоферментного анализа. Парпротеины были иммобилизованы на твердой фазе из сывороток, разведенных 1:10⁵ и 1:10⁶ на 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере pH-9,5. Изотипы тяжелых цепей и типы легких цепей иммуноглобулинов определяли при помощи конъюгатов моноклональных антител МкАТ с пероксидазой хрена [4].

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя анализ стандартных критериев. X²-квадрат использовался для оценки достоверности различий по встречаемости определенных признаков между контрольной группой и группой пациентов ММ. Определение величины "р", соответствующей найденному значению. X²-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^M Версия 7,0 для Windows 95, для Windows-2010, Statistica -5.

Результаты и их обсуждение

Содержание иммунохимических вариантов иммуноглобулинов у больных ММ среди жителей Киргизии при первичной постановке диагноза представлено в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика содержания иммунохимических вариантов

иммуноглобулинов у больных ММ жителей Киргизии

иммунохимические варианты исследуемой группы больных n=108	больные множественной миеломой русскоязычного населения Киргизии n= 86	больные множественной миеломой киргизской национальности n=22
Ig A	32%	68%
Ig M	100%	—
Ig G	69%	31%
Ig E	100%	—
Ig D	—	100%
нет М-пика	100%	—
биклональная опухоль (IgE,Ig A)	—	100%

Примечание: $p < 0,05$.

Показано, что наиболее чаще встречаются Ig A, IgD,(IgE,IgA) и несколько реже IgG у больных ММ киргизской национальности, выявляется Ig A-миелома в 68 % случаев, Ig D-миелома (в 100 % случаев), продуцируется два моноклональных белка – биклональная опухоль Ig A и Ig E-миелома (в 100 %) и Ig G -миелома в 31 % случаев, в то же время как вариант Ig M-миеломы (в 100 % случаев) не выявлялся среди больных множественной миеломой киргизской национальности. В отличие у больных ММ русскоязычного населения Киргизии Ig A-миелома встречается в 32 % случаев, Ig E-миелома в 100 %, Ig G-миелома в 69 % случаев, практически (в 100 % случаев) встречается Ig M-миелома и с отсутствием М-пика и не выявлялся Ig D-миелома среди больных ММ русскоязычного населения.

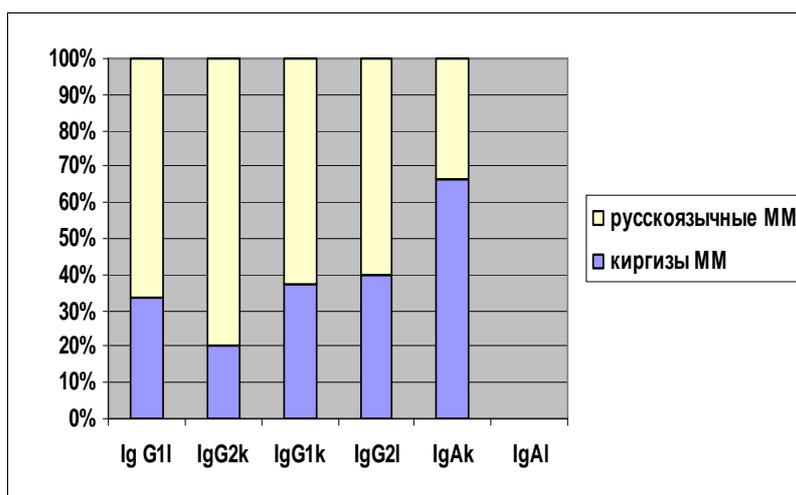


Рис. 1. Тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов у больных с множественной миеломой жителей Киргизии

По результатам проведенного исследования частоты встречаемости тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов среди больных ММ жителей Киргизии, показано, что иммуноглобулин Ig G1 λ -цепи выявляются в 32 % случаев, Ig G2 κ -цепи в 20 % случаев, Ig G1 κ -цепи в 38 % случаев, Ig G2 λ -цепи в 40 % случаев, IgA κ -цепи в 68 % случаев среди больных множественной миеломой киргизской национальности.

У больных ММ среди русскоязычного населения Киргизии выявляются следующие иммуноглобулины Ig G1 λ -цепи в 68 % случаев, Ig G2 κ -цепи в 80 % случаев, Ig G1 κ -цепи в 62 % случаев, Ig G2 λ -цепи в 60 % случаев и Ig A κ -цепи в 32 % случаев. Иммунохимический вариант Ig A λ -цепи не выявлялся среди больных ММ киргизской национальности и среди больных ММ русскоязычного населения Киргизии (рис.1).

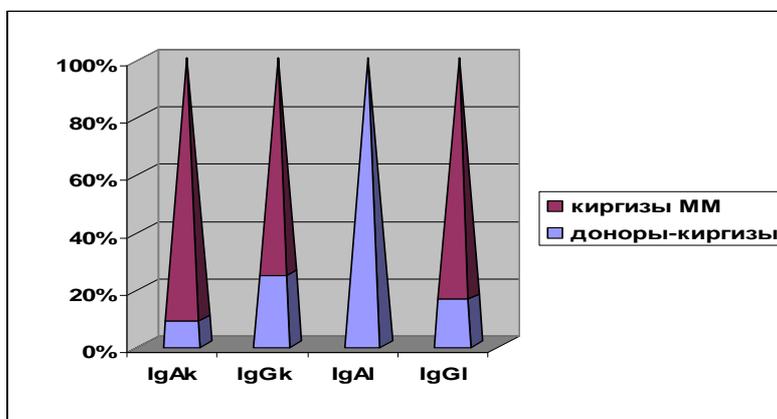


Рис. 2. Изотипы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов у больных ММ и доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности

При сопоставлении встречаемости формы иммунохимического варианта иммуноглобулинов и (κ, λ) легких цепей показано, что у больных множественной миеломой киргизской национальности встречаются вариант IgA κ -цепи в 95 % случаев, Ig G κ -цепи в 80 % случаев, IgG λ -цепи в 85 % случаев и не встречаются IgA λ -цепи. У потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности выявляются IgA κ -цепи в 5 % случаев, Ig G κ -цепи в 20 % случаев, IgG λ -цепи в 15 % случаев и IgA λ -цепи практически в 100 % случаев (рис. 2).

Заключение

Таким образом, при исследовании иммунохимических вариантов иммуноглобулинов с помощью моноклональных антител у больных ММ киргизской национальности чаще выявляются IgA κ -цепи, IgG λ -цепи, несколько реже IgG κ -цепи, практически не выявляется IgA λ -

цепи и среди потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток выявляются повышенные титры иммуноглобулинов IgA-k, IgA-λ, Ig G-k, IgG-λ легкие цепи.

Поскольку среди здоровых потенциальных доноров костного мозга при профилактических исследованиях могут выявляться высокие титры иммуноглобулинов с повышенными (k,λ) цепями, при планировании высокотехнологичного метода терапии близкородственной, неродственной трансплантации и подборе доноров костного мозга при множественной миеломе и при других онкогематологических заболеваниях необходимо – улучшить алгоритм безопасности костного мозга и качественный отбор донора.

Список литературы

1. Андреева Н.Е. Диагностика и лечение множественной миеломы. – М.: Ньюдиамед,1998. – С.67- 88.
2. 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. 7-8.
3. Воробьёв А.И., Кременецкой А.М. Атлас опухоли лимфатической системы. – М.: Ньюмедиамед, 2007. – С. 98.
4. Самойлович М.П., Грязева И.В., Крутецкая И.Ю., Климович Б.В. Исследование парапротеинов с помощью моноклональных антител // Медицинская иммунология. – 1999. – Т.1, № 3;4. – С.82-83.
5. Ludwid H., Meran J., Zojer N. Multiple myeloma: an update on biology and treatment. Ann. oncol. 1999; 10 (suppl,6): 31-43.
6. Fonseca R., Coignet L., Dewald G. Cytogenetic abnormalities in multiple myeloma. – Hematology /Oncology clinics of North America 1999; 13(6):1169-1180.

Рецензенты:

Ценёва Г.Я., д.м.н., профессор ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г.Санкт-Петербург.

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