

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНТИГЕНОВ HLA- АЛЛЕЛЕЙ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ И ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Баратова М.А.³, Баратова Д.А.¹⁻², Джапаркулова А.Д.²⁻⁴, Нурлыханов Е.Б.²⁻⁵

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

²МОО «Национальный Регистр гемопоэтических стволовых клеток Киргизии в Санкт-Петербурге», Санкт- Петербург, Россия. (195197, Санкт-Петербург, проспект Полюстровский, д. 59 литер Щ), e-mail: baratova@list.ru;

³АО «Республиканский научный центр неотложной медицинской помощи» Астана, Казахстан. (010000, Астана, улица Керей-Жанибек хандар, д.3), e-mail: maksat-7brt@list.ru;

⁴ ГУ «Национальный Госпиталь при Министерстве здравоохранения Кыргызской Республики», Бишкек, Кыргызская Республика (720040, Бишкек, улица Тоголок Молдо 1), e-mail: assdzha@list.ru;

⁵ГУ «Областная клиническая больница» Шымкент, Казахстан (160011, Шымкент, улица Майлы- Кожя, д. 4), e-mail: tavshan7@mail.ru

В статье представлены результаты исследований иммуногенетических характеристик больных множественной миеломой и доноров костного мозга киргизской национальности. Типирование проводилось у здоровых доноров киргизской национальности впервые по системе HLA – аллелей I класса локусов (A и B) и HLA – аллелей II класса локуса DRB1*, в сопоставлении с данными больных множественной миеломой киргизской национальности, при этом имеются достаточно высоко достоверные значимые отличия. Выявлены комплексными лабораторными методами значимые HLA-маркеры у киргизской нации. Таким образом, выявленные различия в сопоставлении с контрольной популяционной группой позволят своевременно подобрать доноров костного мозга и применять высокотехнологичные методы лечения, что улучшит выживаемость при множественной миеломе и при других онкогематологических патологиях на раннем этапе заболевания.

Ключевые слова: гемопоэтические клетки, HLA, множественная миелома, доноры, киргизская нация.

IMMUNOGENETIC ASPECTS OF ANTIGENS HLA-ALLELES OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA AND DONORS HEMOTOPOIETIC STEM CELLS

Baratova M.A.³, Baratova D.A.¹⁻², Dzhaparkulova A.D.²⁻⁴, Nurlyhanov E.B.²⁻⁵

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

²"National Register of hematopoietic stem cells Kirghizia in Saint Petersburg "Saint Petersburg, Russia (195197, St. Petersburg, prospect Polyustrovsky 59, liter U), e-mail: baratova@list.ru

³"Republican Scientific Center of Emergency Medical Assistance" Astana, Kazakhstan (010000, Astana, street-Kerey-Janibek handar, 3), e-mail: maksat-7brt@list.ru

⁴ "National Hospital under the Ministry of Health of the Kirghiz Republic" Bishkek, Kirghiz Republic (720040, Bishkek, street Togolok Moldo 1), e-mail: assdzha@list.ru

⁵ "Regional Clinical Hospital" Shymkent, Kazakhstan (160011, Shymkent, street Maily -Kojy, 4), e-mail: tavshan7@mail.ru

The article presents the results of studies of immunogenetic characteristics of patients with multiple myeloma and bone marrow donors kirghiz nationality. Typing were performed in healthy donors kirghiz ethnic first in HLA-class I alleles of loci (A and B) and HLA class II alleles locus DRB1 *, in comparison with the data of patients with multiple myeloma kirghiz nationality, while there are enough highly reliable significant differences. Revealed complex laboratory methods HLA- significant markers in the kirghiz nation. Thus, the observed differences in comparison with the control population group will allow time to pick up a bone marrow donor, and apply high-tech treatments that improve survival in multiple myeloma and other hematological pathologies at an early stage of the disease.

Keywords: hemopoetic stem cells, HLA, multiple myeloma, donors, kirghiz nation.

Множественная миелома (ММ)- это β – клеточное лимфопролиферативное заболевание, основным морфологическим субстратом которого являются клональные плазматические клетки

продуцирующие моноклональный иммуноглобулин Ig A,IgG,IgD,IgE и легкие (κ,λ) цепи.

Общеизвестно, что ММ довольно часто встречается во всех странах у людей всех рас, возраст больных составляет у мужчин- 68 лет, у женщин -70 лет, считается как «болезнь пожилого возраста». В последние годы наблюдается тенденция к омоложению заболевания, чаще встречаются пациенты среднего возраста в популяции 3-4 случая на 100.000 населения в год [4].

Авторами в работе [3] описано, что поскольку заболевание распознается на поздних сроках, отсутствуют критерии изменения в системе крови, которые являются маркерами злокачественного заболевания особенно на ранних этапах её развития.

Проведение аллогенной трансплантации костного мозга в настоящее время проводятся, в основном, больным, имеющим HLA-идентичных сиблингов. Количество таких больных составляет не более 30-35%, которым показана трансплантация костного мозга, в связи с этим предпринимаются усилия по использованию таких категорий доноров, как родственники реципиентов, не полностью совпадающие по HLA-антигенам и неродственные доноры, полностью подобранные по HLA-фенотипу. Наиболее перспективной представляются неродственные доноры, полностью подобранные по HLA-фенотипу.

В тоже время, известно, что, не для всех этнических народов и национальностей можно найти совместимого донора, с этой целью иммуно-селективными методами крайне важно выявление доноров по антигенам комплекса HLA-аллелей I и II классов, при которых идентичность костного мозга донора и больного, свидетельствует об их полной совместимости.

Автором в работе [5] описано, что для каждого этнического народа необходима собственная «контрольная выборка», которая диктуется как популяционно-специфическим характером HLA среди здорового населения, так и возможностью межпопуляционных отличий HLA-маркеров генетической предрасположенностью к тому или иному заболеванию.

В последние годы, среди этнических народов и национальностей сложно найти совместимого донора гемопоэтических стволовых клеток в Европейских и Американских регистрах, что потребовало создания собственного регистра доноров костного мозга,

например, Китая, Японии [1]. И на современном этапе для превращения трансплантации костного мозга в лечебный метод и изучения HLA –генетического разнообразия жителей разных регионов страны, необходимы национальные регистры, которые будут в тесном сотрудничестве осуществлять поиск доноров, а также расширению базы данных о потенциальных донорах гемопоэтических стволовых клеток с идентификацией антигенов гистосовместимости I и II классов.

Тем не менее, из-за мало изученности частоты встречаемости антигенов системы HLA, среди различных этнических народов на сегодняшний день - это вызывает принципиальные трудности.

Авторами в работе [2], проведены изучение иммуногенетических и популяционных характеристик в распределении антигенов по системе HLA -аллелей I и II классов у больных с множественной миеломой киргизской национальности.

Для сопоставления данных результатов больных множественной миеломой киргизской национальности, нами проведено собственное исследование антигенов главного комплекса гистосовместимости у потенциальных доноров киргизской национальности.

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

Материалы и методы исследования

Для изучения иммунологических и популяционных характеристик по системе HLA-аллелей I класса локусов (A и B) были типированы 127 добровольных доноров киргизской национальности (54 женщин и 73 мужчин) из Национального Регистра гемопоэтических стволовых клеток Киргизии с 1998 по 2009 год, из них 78 доноров (16 женщин и 62 мужчин) типированы по II классу локус DRB1* в возрасте от 18 до 50 лет. Исследования проводились в лаборатории иммуногематологии Российского НИИ гематологии и трансфузиологии.

Данные сопоставлялись с контрольной группой – 22 больными множественной миеломой киргизской национальности, наблюдавшиеся в Национальном госпитале при МЗ Киргизской Республики граждане Киргизской Республики, типированные по системе HLA-аллелей I и II классов с 1996 по 1998 г. в лаборатории иммунологии Санкт-Петербургской клинической больницы № 31 (Клинического центра Передовых Медицинских Технологий) [2]. Доставка и транспортировка анализов проводилось в минихолодильных контейнерах при -10 °С.

Типирование HLA-антигенов I-класса.

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

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 концентрации антикоагулянта 0,5 %), с помощью набора реагентов «НПФ ДНК-Технология» Москва или иммуномагнитным методом с использованием набора фирмы «DynaI». 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 $\lambda=320$ nm. Специфичность продукта амплификации сравнивали со стандартным маркером длин ДНК PUC-09.

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя анализ стандартных критериев. χ^2 -квадрат использовался для оценки достоверности различий по встречаемости определенных признаков между контрольной группой и группой пациентов ММ. Определение величины "p", соответствующей найденному значению χ^2 -квадрат, велось по компьютерной программе 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^М Версия 7,0 для Windows 95, для Windows-2010, Statistica-5.

Результаты и их обсуждение

Проведённые нами исследования среди киргизской нации, по системе HLA –I –II классов, показало, что по частоте встречаемости имеются наиболее распространенные и весьма различающие ряды генов.

Иммуногенетические маркеры у больных множественной миеломой и здоровых доноров костного мозга киргизской национальности

При сравнительной характеристике результатов анализа по системе HLA-аллелей 1 класса локусов (А и В) больных множественной миеломой и здоровых доноров киргизской национальности, данные, которых представлены на рисунке, выявляются значимые иммуногенетические маркеры, характерные для больных множественной миеломой киргизской национальности, гены HLA-A24 в 10 % случаев, HLA-A25 в 20%, HLA-A26 в 10 %, HLA-A28 в 20 %, HLA-B7 в 20 %, HLA-B13 в 30,0% и HLA-B14 в 10 % случаев.

Наиболее распространенные у здоровых доноров по частоте встречаемости гены HLA-A24 в 53,1%, HLA-A26 в 20,4%, HLA-B7 в 8,2%, HLA-B13 в 12,2% и несколько реже ген HLA-A25 в 6,1% случаев, практически в единичных случаях встречается ген HLA-A-B14 в 2,0 % и не встречается ген HLA-A28 в 0 % случаев.

По значимости, встречаемости между больными множественной миеломой киргизской национальности и контролем является ген HLA-A25, ген HLA-A28, ген HLA-B7, ген HLA-B13, где имеются статистически высоко достоверные различия $P < 0,001$.

Сопоставление HLA-аллелей II класса локуса DRB1*больных множественной миеломой и здоровых потенциальных доноров костного мозга киргизской национальности