

УДК 616.1.575.616.9.615.1/4

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ НОСИТЕЛЬСТВА ВИРУСА ЭПШТЕЙНА - БАРР, ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Баратова М.А.², Баратова Д.А.^{1,3}, Нурлыханов Е.Б.^{1,4}

¹МОО «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;

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

³НМУ "Евразийский центр онкогематологии, иммунологии и терапии", Санкт-Петербург, Россия. (195197, Санкт-Петербург, проспект Полюстровский д. 59 литер Щ), e-mail: baratova@list.ru;

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

В статье представлены результаты исследований иммуногенетических и популяционных характеристик доноров костного мозга киргизской национальности в сравнении со здоровыми жителями Северо-западного региона Российской Федерации из Российского регистра костного мозга. Установлены высоко достоверные отличия, выявлены значимые HLA-маркеры у киргизской нации; при исследовании на вирусы в группе доноров выявлен вирус Эпштейна-Барр в 26 % и цитомегаловирус в 39 % случаях. У потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток с хроническими очагами инфекций выявлены повышенные титры иммуноглобулинов IgA к λ и Ig G к λ легкими цепями. Таким образом, выявленные различия в сопоставлении с контрольной популяционной группой ставит вопрос о своевременном подборе и выборе потенциальных доноров костного мозга. При наличии HLA-идентичного донора применение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Для качественного подбора донора - улучшить алгоритм безопасности донора костного мозга. На современном этапе трансплантация костного мозга дает наилучшие результаты для увеличения показателей выживаемости при лечении злокачественных заболеваний.

Ключевые слова: HLA, гемопоэтические стволовые клетки, вирусы, доноры, киргизская нация.

IMMUNOGENETICHESKIE INDICATORS AND FREQUENCY OF THE CARRIER EPSTEIN- BARR VIRUS, CYTOMEGALOVIRUS AMONG POTENTIAL DONORS OF HEMOPOETIC STEM CELLS

Baratova M.A.², Baratova D.A.^{1,3}, Nurlyhanov E.B.^{1,4}

¹National Register of hematopoietic stem cells Kirghizia in Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia (195197, St. Petersburg, prospect Polyustrovsky 59, literU), 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 Eurasian Center oncohematology, immunology and therapy, Saint Petersburg, Russia (195197, St.Petersburg, prospect Polyustrovsky 59,literU),e-mail: baratova@list.ru

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

The article presents the results of studies of immunogenetic and population characteristics of bone marrow donors in the kyrgyz ethnic group compared with healthy residents of the Northwest region of the Russian Federation of the Russian register of bone marrow. Set high significant differences were revealed significant HLA-markers in the kyrgyz nation; viruses when tested on a group of donors identified Epstein - Barr virus in 26% and 39% cytomegalovirus cases. Among potential donors of hematopoietic stem cells with chronic foci of infection revealed increased titers of immunoglobulin Ig A k, λ and Ig G k, λ , light chains. Thus, the observed differences in comparison with the control group raises the question of a timely selection of treatment and choice of potential bone marrow donors. At presence of HLA-identical donor use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. For qualitative selection of the donor - to improve the security algorithm and a bone marrow donor. At the present stage, bone marrow transplantation provides the best results for increasing survival in the treatment of malignant diseases.

Keywords: HLA, hemopoetic stem cells, viruses, donors, kyrgyz nation.

В настоящее время трансплантация костного мозга находит все более широкое применение и является одним из высокотехнологичных методов терапии, как за рубежом, так и в нашей стране при лечении онкогематологических, генерализованных аутоиммунных заболеваний, иммунодефицитных состояний.

Общеизвестно, для проведения пересадки костного мозга выбор родственного донора (ГСК) гемопоэтических стволовых клеток существенно ограничен и антигены в распределении по системе HLA-аллелей значительно различаются у представителей этнических народов и национальностей.

Однако далеко не для всех этнических народов можно найти совместимого донора гемопоэтических стволовых клеток в Европейских и Американских регистрах, что потребовало создания собственного регистра доноров костного мозга, например, Китая, Японии [1].

Поскольку HLA-антигены являются признанными иммуногенетическими маркерами многих заболеваний и генетические показатели критериев предрасположенности к онкозаболеваниям, выявление факторов, влияющих на течение болезни и прогноз, является актуальной задачей современной медицинской науки.

В работе [6] описано заболевание с формированием тяжелых цепей иммуноглобулинов, по клинической картине напоминает лимфому. Болеют обычно мужчины, пик заболеваемости приходится на период с 60 до 70 лет. Первыми проявлениями служит увеличение лимфатических узлов, лихорадка и анемия. В костном мозге обнаруживаются лимфоциты в сочетании с плазматическими клетками, нередко наблюдается эозинофилия, при электрофорезе белков сыворотки обнаруживают М-градиент в зоне а или b-глобулинов.

В связи с чем на основе этих данных и возможности скрытого течения подобных заболеваний важно учитывать при планировании неродственной трансплантации и для качественной пересадки костного мозга, где потенциальным донорам, необходимо проводить исследования на изотипы тяжёлых и легких цепей иммуноглобулинов с профилактической целью.

Общеизвестно, что одним из основных факторов неблагоприятного прогноза основного заболевания является присоединение инфекций. Инфекции играют ключевую роль в развитии целого ряда заболеваний, и представляет актуальным изучить распространенность герпес-вирусных инфекций, в частности, обусловленных вирусом Эпштейна-Барр и цитомегаловирусом.

Выполнение трансплантации костного мозга требует строгого соблюдения стандартов безопасности в соответствии с государственными нормативными документами,

регламентирующий деятельность центра единого Республиканского регистра типирования доноров костного мозга, где проводится необходимый перечень исследований с помощью специфичных и высокотехнологичных методов лабораторной диагностики [3]. В этой связи актуальной задачей для получения мониторинговых данных необходимо создать современные информационные тесты с получением достоверных сведений и изучить современные особенности состояния доноров при подготовке их к планированию близкородственной, неродственной трансплантации костного мозга.

При этом следует учитывать, что информация о частоте встречаемости антигенов в системе HLA–аллелей, содержание свободных цепей иммуноглобулинов и распространенности носительства герпес-вирусной инфекции среди различных этнических популяций и национальностей скудна и противоречива.

Целью нашего исследования явилось изучение иммуногенетических характеристик и распространенности носительства вирусов Эпштейна–Барр и цитомегаловируса среди здорового населения – потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности.

Материалы и методы исследования

В группу исследования вошли 127 здоровых потенциальных доноров киргизской национальности из Национального Регистра гемопоэтических стволовых клеток Киргизии в Санкт-Петербурге для изучения иммунологических и популяционных характеристик, типирование проводилось в лаборатории иммуногематологии Российского НИИ гематологии и трансфузиологии с 1998 по 2009 годы по системе HLA–аллелей I класса локусов (A и B), из них 78 донорам по антигенам HLA – аллелей II класса локуса DRB1*, в возрасте от 18 до 45 лет.

Полученные данные сопоставлялись с контрольной группой – 4232 донорами из Российского регистра костного мозга Российского НИИ гематологии и трансфузиологии [5].

А также 78 здоровых доноров киргизской национальности исследованы на носительство вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса в лаборатории молекулярной микробиологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Л. Пастера. Контрольную группу составили 79 здоровых жителей Северо-западного региона Российской Федерации.

Типированы 78 здоровых доноров в лаборатории гибридной технологии ЦНИРРИ на изотипы тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов [2].

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 А и 27 антигенов локуса В с помощью двухэтапного лимфоцитотоксического комплемент-опосредованного теста (Фримель Х., 1979).

Типирование HLA-антигенов II-класса:

Молекулярное типирование HLA- генов локуса DRB1* проводили методом полимеразной цепной реакцией (ПЦР), с использованием набора отечественных праймеров фирмы «ДНК-технология» (Москва), позволяющего выделять 13 групп аллелей HLA-DRB1 базовое разрешение. Геномную ДНК выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (свежей или замороженной при -20°), стабилизированной ЭДТА или цитратом натрия (конечная концентрация антикоагулянта 0,5%), с помощью набора реагентов «НПФ ДНК-Технология» Москва или иммуномагнитным методом с использованием реагентов фирмы «DynaI». Все этапы амплификации проводили 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 учитывали, используя стандартный маркер длин ДНК PUC-09.

Типирование иммуноглобулинов:

Выполнено методом прямого твердофазного иммуноферментного 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 миеломных иммуноглобулинов определяли при помощи конъюгатов моноклональных антител (МКАТ) с пероксидазой хрена [4].

Определение вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса:

Исследование в плазме крови вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса методом (ПЦР) полимеразой цепной реакцией при диагностике использовались «АмплиСенстм» ПЦР тест-системы производства ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ (лицензия №15/002-Л/02) Минпромнауки и технологии РФ на производство иммунобиологических препаратов. Типирование проводилось методом полимеразной цепной реакцией в лаборатории молекулярной биологии ФБУН НИИЭМ имени Пастера г. Санкт- Петербург.

Статистическая обработка полученных результатов включала в себя анализ стандартных критериев χ^2 -квадрат, который использовали для оценки достоверности различий встречаемости определенных признаков между контрольной группой и исследуемой группой.

Определение величины "р", соответствующей найденному значению. Х²-квадрат проводили с учетом одной степени свободы.

Статистический анализ полученных исследований проводили с использованием пакета прикладных программ для Электронных Таблиц – " Microsoft - ExcelM Версия 7,0 для Windows 95, для Windows-2010, Statistica-5.

Результаты и их обсуждение

Проведённые нами исследования среди небольшой группы добровольных потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности в сопоставлении со здоровыми донорами жителей Северо-западного региона Российской Федерации из Российского регистра костного мозга [5], по результатам данных выявлены существенные различия по частоте встречаемости антигенов HLA-аллелей I и II классов.

Таблица 1

Частота встречаемости антигенов HLA-аллелей I класса у здоровых доноров киргизской национальности и здоровых жителей Северо-западного региона Российской Федерации из Российского регистра доноров костного мозга

HLA А и В	Российский Регистр доноров костного мозга n = 4232	доноры киргизской национальности n = 127
A11	11,6%	28,6% ***
A24	20,9%	53,1% ***
A26	10,1%	20,4% **
B37	1,3%	8,2% ***
B48	0,0%	4,1% ***
B51	9,3%	30,6% ***
B57	4,5%	26,5% ***
B63	0,2%	2,0% ***

Примечание. ** — p < 0,05, *** — p < 0,001

Из таблицы 1 видно, что для здоровой киргизской популяции характерна более высокая частота встречаемости в крови аллелей HLA-A24, HLA-A11, HLA -A26, HLA-B51, HLA -B37, HLA-B48 и HLA-B57, HLA-B63. При этом аллели HLA-B37, HLA-B48 и HLA-B63 крайне редки в группе сравнения.

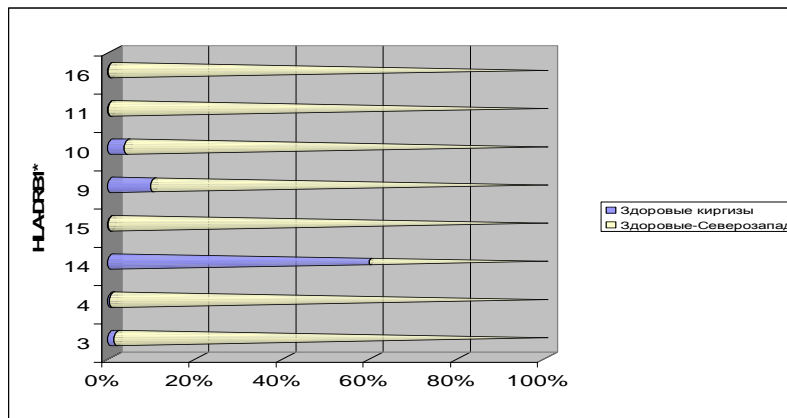


Рис. 1. Сравнительный анализ частоты встречаемости антигенов HLA- локуса DRB1* II класса здоровых доноров киргизской национальности и здоровых жителей Северо-западного региона Российской Федерации из Российского регистра доноров костного мозга

По результатам нашего исследования, при сопоставлении частоты встречаемости антигенов HLA-аллелей локуса DRB1* II класса у здоровых доноров киргизской национальности и здоровых жителей Северо-западного региона Российской Федерации из Российского регистра доноров костного мозга представлены на рисунке 1. Показано, что у здоровых доноров киргизской национальности реже выявляется ген HLA-DRB1*10, практически в единичных случаях встречается ген HLA-DRB1*03 и наиболее распространенный гены HLA-DRB1*14, HLA-DRB1*09 и имеются статистически высоко достоверные различия $p < 0,001$.

Следует отметить, что по значимости антигены HLA-DRB1* 04, HLA-DRB1* 15, HLA-DRB1* 11, HLA- DRB1* 16 для здоровой популяции киргизской национальности является редкостью.

Таблица 2

Содержание свободных цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови у здоровых доноров киргизской национальности

доноры n =78	k-цепи (N=6-13мк/мл)	λ-цепи (N=0,2-1,3мк/мл)	повышенное содержание Ig	пол	возраст
1		2,0	A	м	29
2		1,4	G	м	36
3.	16		G	м	34
4	19		A	м	45

Нами также исследованы 78 здоровых потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток киргизской национальности, считающие себя практически здоровыми людьми, на содержание свободных цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови. Были выявлены в возрасте от 29 – 45 лет повышенные титры иммуноглобулинов типа Ig A k и λ цепями – у 2-х мужчин и Ig G k и λ цепями – у 2-х мужчин. Дополнительно на местах донорам проведены общепринятые клинические исследования: общий анализ крови с подсчетом тромбоцитов, общий анализ мочи, общий белок и ее фракции, рентгенография черепа, печеночные тесты, трансаминазы (АЛТ, АСТ), а также на вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловирус и на инфекции *Helicobacter pylori*. Установлено, что у 2-х мужчин с высокими титрами иммуноглобулинов типа Ig A и Ig G k и λ цепями были обнаружены повышенные титры трансаминаз, положительные результаты на инфекции *Helicobacter pylori* и на вирус Эпштейна – Барр. При этом в анамнезе у двух доноров выявлен хронический энтероколит и

ранее перенесший в детстве вирусный гепатит. Все четверо на момент обследования страдали хроническим пиелонефритом и в общем анализе мочи были обнаружены следы белка.

Исходя из этого можно сказать, что среди здоровых доноров при профилактических исследованиях выявляются в анализах высокие титры иммуноглобулинов типа Ig A, Ig G с повышенными k,λ цепями (таблица 2). Также доноры находятся под наблюдением врача-терапевта, нефролога и нуждаются в ежегодном обследовании.

Результаты изучения на носительство вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса у доноров киргизской национальности и жителей Северо-западного региона Российской Федерации представлены в таблице 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка частоты встречаемости носительства вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса у здоровых доноров киргизской национальности и здоровых жителей Северо-западного региона Российской Федерации

носительство инфекции	доноры киргизской национальности n = 78	жители Северо-западного региона Российской Федерации n = 79
вирус Эпштейна-Барр	26 %**	58 %
цитомегаловирус	39 %**	62%

Из таблицы 3 видно, что частота встречаемости носителей вируса Эпштейна-Барр и цитомегаловируса здоровыми донорами киргизской национальности и здоровыми жителями Северо-западного региона Российской Федерации существенно различается, среди доноров киргизской национальности вирус Эпштейна-Барр выявлен в 26 %, а цитомегаловирус – в 39 % случаев. Клинически носительство не проявлялось. Получены достоверно значимые различия ($p < 0,001$) между донорами киргизской национальности и контрольной группой.

Следует отметить, что полученные данные являются основанием для рекомендации углубленного обследования доноров с целью правильного их подбора при планировании неродственной трансплантации костного мозга.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований в распределении HLA –аллелей I класса установлено, что наиболее часто у доноров киргизской популяции выявляются антигены в локусе A -HLA- A 11, HLA-A24, HLA- A26, локусе B- HLA- B51, HLA- B57, HLA- B37, HLA- B48,HLA-B63 и наиболее часто встречаются в распределении HLA –аллелей II класса локуса

DRB1* гены HLA -DRB1*14, HLA- DRB1*09, несколько реже ген HLA-DRB1*10 и практически в единичных случаях ген HLA- DRB1*03.

Выявленные различия антигенов в распределении HLA-аллелей, повышенные титры иммуноглобулинов к,λ легкими цепями, наличие носительства возбудителей вирусной инфекции, необходимо учитывать при планировании близкородственной, неродственной трансплантации костного мозга при злокачественных заболеваниях.

Потенциальным донорам костного мозга дополнительно в перечень критериев отбора необходимо определение на наличие носительства вируса Эпштейна-Барр, цитомегаловируса и содержание свободных цепей иммуноглобулинов в сыворотке крови, с целью профилактики осложнений в посттрансплантационном периоде.

На современном этапе для успешного поиска донора костного мозга необходимо расширять и развивать базы данных о потенциальных донорах гемопоэтических стволовых клеток.

Однако тесное сотрудничество с регистрами костного мозга других стран – это наиболее эффективное направление превращение трансплантации костного мозга в лечебный метод.

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.— 3с.
2. Баратова Д.А., Баратова М.А., Джапаркулова А.Д. Клинико-диагностические исследования иммунохимических вариантов иммуноглобулинов с помощью моноклональных антител у больных множественной миеломой и потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. [Электронный ресурс]// Современные проблемы науки и образования. – 2014. - № 4; URL: <http://www.science-education.ru/118-13941> (дата обращения: 15.07.2014).
3. Приказ Министерство здравоохранения РСФСР от 25 февраля 1991. № 31 «О Внедрении в практику здравоохранения трансплантации костного мозга».
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. Селиванов Е.А., Бубнова Л.Н. Генетические особенности главного комплекса гистосовместимости доноров стволовых гемопоэтических клеток // Медицинский академический журнал.—2006.— Т. 6, № 1.— С. 90-94.

6. Хоффбрант В., Петтит Дж. Болезнь тяжелых цепей // Справочник Гематология., Под. ред. Е.Р. Тимофеевой. – М., Практика. 2007.— С. 285-286.

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.