

0717731-1

На правах рукописи

ТАМАКОВА ВЕРА ПАВЛОВНА

**HLA-ФЕНОТИП И СОСТОЯНИЕ
ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА У ЖИТЕЛЕЙ
РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН**

14.00.36 - аллергология и иммунология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Казань
2000**

Работа выполнена в Казанской государственной медицинской академии и Республиканской клинической больнице МЗ РТ

Научный руководитель — доктор медицинских наук,
профессор А.П.ЦИБУЛЬКИН

Официальные оппоненты — доктор медицинских наук,
профессор Л.И.КРАСНОПРОШИНА
— доктор медицинских наук,
профессор Н.К.ГОРЛИНА

Ведущее учреждение, дающее отзыв о научно-практической значимости диссертации, — Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов Минздрава РФ

Защита состоится “___” июня 2000 г. в ___ часов на заседании специализированного совета Д.001.38.01 при Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова РАМН по адресу: 103064, Москва, Малый Казенный пер., д.5а.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова РАМН.

Автореферат разослан “___” _____ 2000 г.

*Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук*

И.В.ЯКОВЛЕВА

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КГУ



0000498204



Актуальность темы. В последние годы возросло количество исследований, направленных на изучение ассоциативных связей системы HLA с заболеваниями (Наумов Ю.Н., Коненков В.И., 1994; Алексеев Л.П., Хайтов Р.М., 1996; Акопян А.В. и соавт., 1998; Dausset J., 1990; Bodmer W.F., 1992). Поиск генетических маркеров заболеваний активно проводится и в Республике Татарстан (Исмагилов Ш.М., 1995; Кузьмина А.А., Латфуллин И.А., Курмышкин А.А., 1996). Все большее значение приобретает новое направление в изучении “HLA и болезней” – установление особенностей иммунного статуса человека в зависимости от HLA-фенотипа (Яздовский В.В., 1995; Хайтов Р.М., Алексеев Л.П., 1998; Hill A.V.S., 1998).

Актуальность данных исследований определяется важной биологической ролью системы HLA в детерминировании иммунного ответа организма на повреждающие воздействия факторов внешней среды (Зотиков Е.А. 1990; Doherty P.C., 1974; Zinkernagel R.M., 1992). Исходя из концепции о том, что иммунный ответ генетически детерминирован, представляет теоретический и практический интерес изучить влияние генетических факторов на клинической модели механической травмы. Установление таких маркеров открывает возможность формировать группы риска развития заболевания и, что не менее важно, устанавливать индивидуальный подход к прогнозу и методам лечения.

Существующее представление о взаимосвязи HLA-комплекса с заболеваниями требуют точного знания распространенности частот антигенов HLA среди здоровых лиц исследуемой популяции (Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю., 1986; Baur M. P., 1984; Pauls W. E., 1984). Это связано с достаточно выраженной изменчивостью и своеобразием профилей частот антигенов HLA в различных популяциях, зависящих от их расового и этнического разнообразия, исторически обусловленного вклада в генофонд генетического материала других рас и национальностей, географического расположения ареала проживания и, возможно, других, пока невыясненных факторов среды (Минев М.И., 1984). Население

Республики Татарстан по этническому составу неоднородно и одной из наименее изученных в иммуногенетическом плане является татарская популяция.

Цель работы.

Установить иммуногенетический профиль основных этнических групп населения Республики Татарстан и изучить зависимость между HLA – фенотипом и состоянием функциональной активности иммунной системы на клинической модели механической травмы.

Задачи исследования.

1. Изучить распределение частоты HLA -A, B, C, DR антигенов, генов и величины неравновесного сцепления генов в основных этнических группах населения Республики Татарстан.

2. Провести популяционно-генетический анализ татарской популяции в сравнении с другими этническими группами и расами.

3. Установить распределение антигенов HLA и их взаимосвязь с состоянием функциональной активности иммунной системы на клинической модели механической травмы.

4. Определить информативность иммуногенетических факторов в качестве основы для разработки критериев риска развития гнойно-воспалительных осложнений у хирургических больных.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. HLA-профиль основных популяций населения РТ характеризуется широким полиморфизмом аллелей локусов A, B, C и DR.

2. Татарская популяция обладает своеобразием частотного распределения HLA-аллелей, при этом характер распределения близок к европеоидному. Специфическими особенностями татарской популяции являются повышение частоты встречаемости антигенов B13, B21, B53, Cw2 и снижение A19, B22, B52, DR4.

3. Антигены HLA-B35, DR2, DR3 могут служить маркерами нарушений функциональной активности иммунной системы при механической травме. Присутствие в фенотипе HLA-B35 сопряжено со снижением концентрации им-

И. И. Лобозовского
 Республиканского ЦОУ, Уфа, Татарстан

муноглобулина G, HLA-DR2 – со снижением количества CD4+лф, HLA-DR3 – со снижением количества CD8+ лф и уровня фагоцитарной активности нейтрофилов.

4. Антигены HLA, ассоциированные с нарушениями иммунного гомеостаза, могут служить информативным критерием для выделения контингентов повышенного риска развития гнойно-воспалительных осложнений у лиц с механической травмой.

Научная новизна исследования.

Впервые:

1. Изучен HLA-генетический профиль распределения антигенов локусов HLA A, B, C, DR по широкому спектру аллелей, гаплотипов и гаметных ассоциаций в татарской популяции у жителей Республики Татарстан;

2. Установлены различия в частоте встречаемости антигенов и гаплотипов в татарской популяции по сравнению со среднеевропейскими данными;

3. Изучены иммуногенетические маркеры, ассоциированные с типом иммунного ответа и особенностями течения травмы у посттравматических больных;

4. Раскрыты механизмы реализации ассоциативных связей с особенностями иммунного ответа, определяющего форму гнойно-воспалительного осложнения.

Практическая ценность работы.

1. Установлен HLA – профиль татарской популяции Республики Татарстан с тестированием 12 специфичностей локуса A, 23 специфичностей локуса B, 4 специфичностей локуса C, 7 специфичностей локуса DR, что необходимо для дальнейших популяционных исследований и изучения проблемы “HLA и болезни”.

2. Установлена генетическая близость татарской популяции с европеоидами, подтверждающая целесообразность обмена донорскими органами с трансплантологическими службами России и Европы.

3. Определены наиболее значимые лабораторно-иммунологические показатели в развитии гнойно-воспалительных осложнений, которые могут быть использованы для диагностики вторичных иммунодефицитных состояний.

4. Установленные положительные ассоциации антигенов и гаплотипов HLA могут быть использованы для формирования контингентов повышенного риска развития гнойно-воспалительного осложнения у хирургических больных.

5. Метод HLA-типирования совместно с показателями иммунограммы может быть использован в качестве важного прогностического критерия развития послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у хирургических больных.

Внедрение в практику .

1. Иммуногенетические параметры здорового населения данного региона используются в научных разработках КГМА и КГМУ в качестве контрольной нормы при изучении ассоциативных связей HLA с заболеваниями.

2. Метод HLA-типирования внедрен в практику подбора пары “донор-реципиент” при проведении трансплантации почки в РКБ и БСМП г. Набережные Челны.

3. Определение HLA-фенотипа с 1993 года широко используется в практической деятельности неврологического и ревматологического отделений РКБ и 1 городской больницы г. Казани для диагностики аутоиммунных и неврологических заболеваний.

Апробация работы.

Результаты исследования доложены и обсуждены на заседании проблемной комиссии по клинической аллергологии, иммунологии и фармакологии КГМА (Казань, 1991), доложены на совместном заседании кафедр клинической лабораторной диагностики КГМА и патофизиологии КГМУ (Казань, 1999), а также на научно-практических конференциях: “Актуальные вопросы трансплантации почки” (Казань, 1997, 1998) и “Актуальные вопросы урологии, нефрологии и заместительной почечной терапии” (Бугульма, 1999).

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на _____ страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 3 глав результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, практических рекомендаций. Диссертация иллюстрирована 21 рисунком, 29 таблицами. Библиография включает 246 источников, из них 125 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения иммуногенетической характеристики здоровой популяции были исследованы HLA антигены у 191 жителя республики Татарстан. Обследуемая выборка состояла из 121 представителя татарской национальности, 70 - русской, клинически здоровых, лиц, не состоявших в кровном родстве и проживающих в течение 2-3 поколений на территории РТ. Иммуногенетические параметры здорового населения были использованы в качестве контрольной нормы для сравнения.

Связь HLA антигенов с иммунным ответом была изучена у 121 посттравматического хирургического больного. Обследованные больные лечились в отделениях гнойной хирургии и травматологии Республиканской клинической больницы и НИИ "Восстановительная травматология и ортопедия" г.Казани. Больные с травмой в зависимости от исхода травматической болезни были разделены согласно критериям оценки клинического течения (Кузин М.И., Костюченко Б.М., 1990) на 2 основные группы: 1 группа - осложненное течение травмы (ОТТ) - 85 человек и 2 группа - благоприятное течение травмы (БТТ) - 36 человек. Состав групп по возрасту (средний возраст - $36,2 \pm 1,8$ лет в группе больных с БТТ и $35,6 \pm 1,3$ лет в группе больных с ОТТ), степени тяжести травмы, наличию сопутствующих заболеваний и применяемым методам лечения (за исключением группы больных с сепсисом) был идентичным.

Первая группа больных с ОТТ с учетом преобладающей локализации и степени генерализации гнойно-воспалительного процесса (Кузин М. И. и соавт., 1985 год) была в свою очередь разделена на 3 клинические подгруппы.

Первая клиническая подгруппа включила 37 больных с остеомиелитом. Вторая клиническая подгруппа включила 29 больных с гнойно-воспалительными инфекциями мягких тканей, с затяжным рецидивирующим течением, не осложненными остеомиелитом. В третьей клинической подгруппе находились под наблюдением 19 человек с обширными гнойно-воспалительными инфекциями мягких тканей, имеющих тенденцию к генерализации процесса с развитием сепсиса.

Всем больным проводилось хирургическое лечение, назначалась антибактериальная и патогенетическая терапия, а при осложнениях – также иммунокорректирующее лечение. Лечение больных с травмой длинных трубчатых костей осуществлялось по методике чрезкостного компрессионно-дистракционного остеосинтеза по Г.А.Илизарову. Клинико-anamnestические данные анализировались по 121 истории болезни.

Основным клиническим критерием первой группы больных с ОТТ являлось затяжное рецидивирующее течение заболевания (свыше 2 месяцев). В анамнезе имелись указания на многократные рецидивы (не менее 2-3 раз в год) и оперативное вмешательство. Характерной была низкая эффективность антибиотикотерапии. Обильные гнойные выделения из свищей наблюдались в 70% случаев. По данным бактериологических исследований раневая микрофлора больных представлена в 78,2% наблюдений в виде микробных ассоциаций. Ведущими возбудителями являются *Staphylococcus aureus*-44,7%, *Pseudomonas aeruginosa*-23,8%, *Proteus mirabilis* и *vulgaris*-23,5%, *Streptococcus* группы А и D-18,0%. В 84% случаев раны заживали вторичным натяжением с вялым ростом грануляций и замедленной эпителизацией. Длительный субфебрилитет отмечался у 67,4% больных, ускоренное СОЭ - у 78,2% больных.

Во второй группе больных с БТТ динамика основных клинических критериев была положительной. Наблюдалась нормализация температуры в сроки 5-7 дней, со стороны послеоперационной раны отсутствовали признаки воспаления и заживление шло первичным натяжением (75,3%) в сроки 10-14 дней. У больных с инфицированными ранами и явлениями гнойно-воспалительного

процесса очищения от гнойного содержимого происходило в течение 2-3 недель. По данным рентгенограммы наблюдались процессы репарации костных фрагментов. СОЭ и показатели иммунограммы возвращались к норме в среднем на 14-21 день.

Лабораторная оценка состояния иммунной системы проводилась *in vitro* HLA фенотипы устанавливали в стандартном микролимфоцитотоксическом тесте (A, B, C - типирование) и удлинённом микролимфоцитотоксическом тесте (DR - типирование) (Terasaki P., 1963). Были использованы HLA-типизирующие сыворотки Российского НИИ гематологии и переливания крови г.Санкт-Петербурга и HLA-типизирующие сыворотки Белорусской станции переливания крови. Гипотипизирующая панель антисывороток позволяла обнаружить 12 специфичностей локуса A, 23 специфичности локуса B, 4 специфичности локуса C и 7 специфичностей локуса DR.

Иммунный статус больных оценивался в динамике по показателям иммунограммы и включал 26 параметров с использованием унифицированных методов исследования (Петров Р.В., 1983, Барышников А.Ю., 1989). Исследование иммунограммы проводилось в послеоперационном периоде в 1-5 сутки (острый период воспаления) и в динамике на 15-20 сутки (период ремиссии или реконвалесценции).

По результатам HLA – типирования в исследуемых группах рассчитывали частоту встречаемости антигена, гена, частоту фенотипов, гаплотипов и величину гаметной ассоциации для генов разных локусов (Певницкий Л.А., 1988; Thomson G., 1981). Достоверность различия между группами оценивали с использованием критерия χ^2 с учетом поправки на непрерывность Yates. Между популяциями и крупными этническими группами рассчитана генетическая дистанция.

Оценка различий иммунологической реактивности проводилась с использованием программы “Excel”, с определением среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического (m). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Стьюдента при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Популяционный анализ основных групп населения РТ

HLA-профиль татарской популяции позволяет выявить черты, характерные для европеоидов, с незначительным включением генов монголоидов (табл. 1). Характерен широкий полиморфизм антигенов. Наиболее частотными аллелями в локусе А у татар являются А2 (50,4%), А9 (33,1%), А10 (26,4%), А3 (21,5%) и А1 (18,2%), что, в целом, соответствует данным о наиболее частотных HLA-аллелях локуса А в большинстве популяций европеоидов. Самым редким антигеном в этом локусе является антиген А29 (2,1%).

В локусе В с высокой частотой представлены HLA-B7 (19,8%), В13 (18,2%), В12 (16,5%), В44 (14,0%), В35 (14,9%), В15 (14,9%), В62 (13,2%). К редким антигенам, которые встречаются в фенотипе с частотой 3,3% и менее относятся антигены: В14, В22, В45, В50, В52 и В63. Локус HLA-B у европеоидов характеризуется преимущественной встречаемостью антигенов В5, В7, В8, В12, В35, у монголоидов – В5, В15, В22, В40, а также крайне низкими частотами антигенов В8 и В18. У татар локус HLA – В был представлен преимущественно антигенами В7, В12, В18, В35, характерными для европеоидов. Частота антигенов В8, В22 была снижена относительно европеоидов, а частота антигенов В5, В40, В22 относительно монголоидов.

В локусе HLA – С наиболее часто встречались антигены Сw2 и Сw4 (23,1%), далее в порядке убывания Сw3 (17,4%) и Сw5 (5,0%).

Из 7 определяемых нами специфичностей локуса DR, частота DR2 составила 40,4%, DR5 - 39,5%, DR7 - 27,2%, DR1 - 22,8%, далее убывающий частотный ряд составили HLA-антигены DR4 - 15,8%, DR3 и DR6 - 12,3%. Распределение антигенов в локусах Сw и DR также свидетельствует о сходстве их распространенности у европеоидов.

Специфическими особенностями обследованной популяции, отличающими ее как от европеоидов, так и от монголоидов, являются повышение частоты антигенов В13, В53, В21, Сw2 и снижение А19, В22, В52 и DR4. Некото-

рые отличия, касающиеся вышеуказанных антигенов, не нарушают вывод о европеоидном характере распределения HLA-генов татарской популяции с наличием некоторых особенностей, присущих восточноевропейским популяциям.

Таблица 1
Распределение HLA-антигенов и генов в татарской популяции

Антиген	Частота антигена %	Частота гена	Антиген	Частота антигена %	Частота гена
A1	18,2	0,0955	B17	5,8	0,0294
A2	50,4	0,2958	B18	12,4	0,0640
A3	21,5	0,1139	B49(21)	10,7	0,0552
A11	6,6	0,0336	B50(21)	3,3	0,0167
A23(9)	6,6	0,0336	Bw22	1,7	0,0083
A24(9)	26,4	0,1424	B27	8,3	0,0422
A25(10)	9,1	0,0465	B35	14,9	0,0774
A26(10)	12,4	0,0640	B40	14,0	0,0729
A28	10,7	0,0552	B41	3,3	0,0167
A29	1,7	0,0083	Bw47	2,5	0,0125
A30+31	5,8	0,0294	B53	5,8	0,0294
A32	10,7	0,0552	BX	12,4	0,0640
AX	19,8	0,1046	DR1	22,8	0,1214
B51(5)	10,7	0,0552	DR2	40,4	0,2277
B52(5)	1,7	0,0083	DR3	12,3	0,0634
B7	19,8	0,1046	DR4	15,8	0,0823
B8	8,3	0,0422	DR5	39,5	0,2220
B44(12)	14,0	0,0729	DR6	12,3	0,0634
B45(12)	2,5	0,0125	DR7	27,2	0,1467
B13	18,2	0,0955	DRX	29,8	0,1623
B14	3,3	0,0167	Cw2	23,1	0,1233
B62(15)	13,2	0,0685	Cw3	17,4	0,0909
B63(15)	1,7	0,0083	Cw4	23,1	0,1233
B38(16)	6,6	0,0336	Cw5	5,0	0,0251
B39(16)	5,0	0,0251	CwX	131,4	0,6374

Наши исследования показывают, что характер гаплотипических сочетаний и их встречаемость в татарской популяции также достаточно близки с распространенностью гаплотипов HLA у европеоидов. К гаплотипам, часто встречающимся как у европеоидов так и у татар, относятся A1-B8; A2-B44; A25-B18; A1-DR3; D27-Cw2; B35-Cw4; B12-Cw5; B8-DR3; B13-DR7; B44-DR7;

B62-Cw3. В отличие от большинства европеоидов наиболее высокочастотным HLA-гаплотипом является не только B8-DR3, а также HLA B13-DR7 ($H=0,0477$; $D=0,0337$).

Характеризуя распределение HLA-антигенов в популяции, нельзя не учитывать феномен неравновесного сцепления между разными локусами, отражающий особенность этой популяции (Vodmer W.F. et al., 1978; Tsuj K. et al., 1991). Неравновесное сцепление между аллелями локусов в наибольшей степени выражено для гаплотипов A1-B8; A25-B18; A2-B44; A3-B62; A24-B35; A23-B13; B35-Cw4; B40-Cw2; B27-Cw2; B62-Cw3; B8-DR3; B13-DR7; B35-DR5; B44-DR7; B35-DR6; B63-DR6. Среди них наибольшую частоту и величину неравновесного сцепления имеют HLA-гаплотипы A1-B8 ($H=0,0284$; $D=0,0244$), B8-DR3 ($H=0,0400$; $D=0,0373$), наиболее характерные для европеоидов (табл.2).

Таблица 2

Частоты некоторых теоретических HLA-гаплотипов ($H \times 10000$) и величины неравновесного сцепления ($D \times 10000$) в татарской популяции

HLA-гаплотипы	D	H	HLA-гаплотипы	D	H
A1-B8	244***	284	B27-Cw2	275***	327
A1-B63	75**	83	B35-Cw4	439***	535
A2-B44	214*	429	B40-Cw2	303***	392
A3-B62	225**	303	B62-Cw3	345***	408
A3-Bw22	73**	83	B8-DR3	373***	400
A11-B52	37**	40	B13-DR7	337***	477
A11-B17	67**	77	B14-DR1	106**	126
A11-Bw22	37**	40	B17-DR7	110*	154
A23-B13	120***	152	B35-DR5	235*	407
A24-B35	167*	278	B35-DR6	141*	190
A25-B18	391***	421	B44-DR7	240**	347
A26-B38	136***	158	B45-DR2	102*	131
A32-B40	102*	142	B50-DR1	106**	126
A1-Cw5	89*	113	B52-DR2	125***	144
A1-DR3	221***	282	B63-DR6	125***	143
B12-Cw5	138***	160			

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

Частота встречаемости HLA-антигенов и характер гаплотипических сочетаний в русской популяции РТ отражает их распространенность у европеоидов. В популяции русских, проживающих на территории республики, по данным наших исследований наиболее распространены антигены: A1, A2, A3, A9, B7, B8, B12, Cw4, DR1, DR2, DR5. HLA-антигены A29, B14, B22, B45, B47, B63, напротив, имеют низкую частоту встречаемости. В русской популяции данного региона широко распространены гаплотипы A1-B8; A2-B7; A2-B44; B27-Cw2; D40-Cw2; B15-Cw3; B35-Cw4; B7-DR2; B8-DR1; B8-DR3, что наблюдается и у европеоидов. Чаще, чем у европеоидов, встречаются HLA-антигены A9, B13, B18, B53, DR1, DR5 и реже A11, A29, B8, B14, B44, Cw5. Анализ частоты антигенов в подгруппах татар и русских, проживающих на территории Татарстана, свидетельствует о сходстве их распределения, что связано, по-видимому, с процессами ассимиляции и взаимопроникновения этнических групп.

Сравнительная оценка коэффициента генетической дистанции между татарами и крупными расовыми группами показывает, что татары более близки к европеоидам ($d=2,68 \cdot 10^{-2}$) и достаточно отдалены от монголоидной расы ($d=5,23 \cdot 10^{-2}$). Из изучаемых популяций татарская популяция оказалась наиболее близкой к русским, проживающим на территории Европейской части России ($d=2,29 \cdot 10^{-2}$). Русские, проживающие на территории Татарстана, как и татары, имеют почти аналогичные генетические дистанции с европеоидами ($d=2,51 \cdot 10^{-2}$) и с монголоидами ($d=6,8 \cdot 10^{-2}$).

Таким образом, установлен HLA-генетический профиль татарской популяции Республики Татарстан по широкому спектру HLA-аллелей локусов A,B,C и DR, что может служить справочным материалом в популяционных исследованиях. Детальный анализ HLA-профиля татарской популяции свидетельствует о том, что данная этническая группа обладает рядом характерных только для неё особенностей и занимает промежуточное место между представителями европеоидной и монголоидной рас с преобладанием европеоидного профиля, что подтверждается данными других авторов (Курмышкин А.А., 1993, Исмагилов

Ш.М., 1996). Своеобразие HLA- генетических черт татарской популяции согласуется и с литературными данными, свидетельствующими о сложном этногенезе татар, а также о высокой генетической гетерогенности популяции (Гумилев Л.Н., 1967; Халиков А.Х., 1978).

2. Динамика иммунологических показателей при различных течениях посттравматического периода

Полиморфизм HLA-системы затрудняет адаптацию инфекционных агентов в человеческой популяции (Исхаков А. Т., 1994; Хаитов Р. М., Алексеев Л. П., 1998). Возникновение и течение гнойно-хирургической инфекции зависит от свойств микрофлоры и состояния иммунной системы, в первую очередь от особенностей взаимоотношений между ними (Смолянников А. Б., Соркисов Д. С., 1982). Одной из основных причин неблагоприятных исходов у посттравматических больных является “низкая” иммунологическая реактивность организма.

В остром периоде заболевания у посттравматических больных наблюдалось повышение всех иммунологических показателей по сравнению с контролем. У 62,9% больных с благоприятным течением и у 55,7% с осложненным течением наблюдался гиперреактивный иммунный ответ, наиболее характерными признаками которого являются лейкоцитоз, нейтрофилез, повышение субпопуляций Т-лф: CD3+, CD4+, CD8+ и фагоцитарной активности нейтрофилов. Однако в группе больных с ОТТ отмечалось более значительное повышение уровня CD8+ клеток ($0,6 \pm 0,1 \cdot 10^9/\text{л}$, $p < 0,05$) и снижение иммунорегуляторного индекса (ИРИ) ($1,2 \pm 0,1$) по сравнению с БТТ. Уровень сывороточных иммуноглобулинов оставался в пределах нормы. На изменение параметров иммунной системы в острую фазу воспаления оказывают значительное влияние факторы стресса (болевого шок, оперативное вмешательство и т.д.), что скорее всего, определяет характер иммунного ответа.

В периоде реконвалесценции при благоприятном течении травмы показатели иммунограммы не достигли значений контрольной группы и оставались несколько повышенными. Однако все показатели меняются однонаправленно,

что отражает координированную работу всех звеньев иммунитета и является залогом успешной санации очага инфекции.

При неблагоприятном течении травмы в период ремиссии сохранялось повышенное количество CD8⁺ лф, относительное (25,1±1,2%) и абсолютное (0,6±0,04*10⁹/л p<0,05), что сопровождалось снижением ИРИ (1,2±0,1) по сравнению с соответствующими данными больных с БТТ. Содержание IgG в крови больных с ОТГ (16,5±0,8 г/л, p<0,05) ниже соответствующего показателя больных с БТТ (19,8±2,0 г/л). НСТ-стимулированный снижен у 21,8% больных по сравнению с контролем, в то время как у больных с БТТ только у 8,8%. Наиболее глубокие изменения в иммунном статусе обнаружены в группе больных с гнойно-септическим состоянием.

Таким образом, в остром периоде заболевания в группе больных с осложненным течением травмы по сравнению с благоприятным наблюдалось более значительное снижение показателей клеточного иммунитета: CD4⁺ лф и ИРИ. В периоде ремиссии наряду с дисбалансом иммунорегуляторных клеток отмечалось снижение уровня IgG. Вероятно, нарушения в системе иммунокомпетентных клеток и их межклеточных взаимодействий, выявленные у больных с гнойно-воспалительными осложнениями, могут привести к развитию вторичного иммунодефицитного состояния. Биологические дефекты той или иной системы иммунитета у практически здорового человека длительное время компенсируются. Когда эти возможности исчерпываются, наступает клиническая манифестация, что и наблюдается при воздействии механической травмы.

3. HLA- фенотип и характер иммунного ответа при воздействии травмы

Установленные иммуногенетические параметры здорового населения позволили провести исследование, направленное на поиск ассоциаций HLA-антигенов с функциональной активностью клеток иммунной системы. В группе больных с ОТГ имелись характерные особенности в частоте встречаемости антигенов системы HLA. У этих больных чаще выявлялись антигены A11 (14% при 6,3% в контроле, p<0,05), B35 (32,9% при 18,3% в контроле, p<0,01), DR2 (53,9% при 38,1% в контроле, p<0,05), DR3 (32,9% при 17,0% в контроле,

$p < 0,01$, $p_{\text{corr}} < 0,05$) (рис.1). Носительство данных антигенов повышает риск развития гнойно-воспалительного осложнения (ГВО) в 2-2,5 раза относительно общей популяции. Для аллелей HLA-11 и B35 установлено неравновесие по сцеплению ($H=0,0439$; $D=0,0307$; $p < 0,001$). Первично с заболеванием ассоциирована аллель HLA-B35 ($EF=0,173$), вторично - аллель A11 ($EF=0,083$).

Анализ частоты встречаемости антигенов HLA-B35, DR2, DR3 в подгруппах татар и русских показал одинаковое повышение исследуемых антигенов у больных с неблагоприятным течением травмы. В подгруппе татар с неблагоприятным исходом травмы чаще, чем в контроле присутствовали антигены HLA-B35 (29,1% против 14,9%, $p < 0,05$), HLA-DR2 (59,5% против 40,5%, $p < 0,05$), HLA-DR3 (31,0% против 12,4%, $p < 0,01$, $p_{\text{corr}} < 0,05$). В подгруппе больных русской национальности с неблагоприятным течением травмы наблюдалось аналогичное повышение антигенов: HLA-B35 (37,8% против 24,3% контроля), HLA-DR2 (58,8% против 34,3% контроля, $p < 0,05$), HLA-DR3 (35,3% против 25,7% контроля).

Следовательно, этнический признак не оказывает существенного влияния на HLA-ассоциированность с гнойно-воспалительными заболеваниями. С этими аллелями связаны заболевания, протекающие с иммунными нарушениями в большинстве европеоидных популяций (Шабалин В. Н., Серова Л. Д., 1988; Алексеев Л. П., Хаитов Р. М., 1988).

В группе больных с благоприятным течением травматической болезни значимое различие в распределении HLA-антигенов установлено в отношении носителей HLA-B40 (27,8% против 10,5% в контроле, $p < 0,05$ и 27,8% против 9,4% в ОТТ, $p < 0,01$) и DR6 (14,7% против 5,3% в ОТТ, $p < 0,05$) (рис.2). Поэтому B40 и DR6 могут быть расценены как факторы, обеспечивающие резистентность к возможному развитию гнойно-воспалительного заболевания. Из них наибольший «протективный» эффект отмечен для антигена DR6, что совпадает с исследованиями других авторов (Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю., 1986).

Фенотип тканей организма представлен достаточно большим числом антигенов. Поэтому более перспективным является комплексный подход к анали-

зу HLA-показателей, включающий рассмотрение фено и гаплотипов. В группе больных с ОТТ по сравнению с контролем выявлено увеличение частоты встречаемости гаплотипов: A2-B35 RR-3,57 $p_{\text{corr}} < 0,05$; A3-B35 RR-2,7; A11-B35 RR-6,51 $p_{\text{corr}} < 0,05$; DR2-CW4 RR-4,56 $p_{\text{corr}} < 0,01$; A11-DR2 RR-6,1; A11-DR3 RR-12,32; A2-CW2 RR-2,66 $p_{\text{corr}} < 0,05$; A11-CW4 RR-6,51 $p_{\text{corr}} < 0,01$; B35-DR2 RR-9,71 $p_{\text{corr}} < 0,005$; B35-DR3 RR-2,82; B35-B44(12) RR-21,1 $p < 0,01$; DR2-DR3 RR-5,3 $p_{\text{corr}} < 0,01$ (рис.3). Из установленных связей семь ассоциаций подтверждены по значению p_{corr} . Это позволяет прогнозировать риск развития ГВО значительно превышающий среднестатистический по популяции (рис.4).

Частота встречаемости гаплотипов: A1-DR5 PF-6,64; A1-DR1 PF-6,72; A24(9)-DR4 PF-6,72; DR5-B49(21) PF-6,72; DR5-B40 PF-6,71 напротив. была значительно снижена в первой группе больных (рис. 5). Следовательно. присутствие антигенов A1, DR1, DR5, B13, B40, B39 является протективным генотипическим фактором и усиливает свое действие при одновременном сочетании в HLA-фенотипе (рис. 6).

Были также рассчитаны гаплотипы, аллели которых с высокой степенью достоверности находятся в неравновесном сцеплении: A1-B22 ($H=0,018$, $D=0,0108$), A11-B35 ($H=0,0439$, $D=0,0307$), A11-Cw4 ($H=0,0444$, $D=0,0299$), B18 - DR4 ($H=0,0256$, $D=0,023$), A25-DR4 ($H=0,0181$, $D=0,0152$), A23-B49 ($H=0,0117$, $D=0,011$), что нехарактерно для здоровой популяции. Четыре из гаплотипов A11-B35, A11-Cw4, B18-DR4, A25-DR4 вошли в расширенные гаплотипы, ассоциированные с посттравматическими гнойно-воспалительными процессами: A11-B35-Cw4; A25-B18-DR4. Как полагают W. Bodmer и J. Bodmer (1978), неравновесное сцепление представляет собой оптимальное сочетание аллелей близлежащих локусов, ассоциированных с иммунным ответом. Обнаружение устойчивых HLA-гаплотипов, нехарактерных для исследуемой популяции в целом, может служить косвенным свидетельством HLA-ассоциированности заболевания, и связанным с данным гаплотипом неадекватным иммунным ответом (Зарецкая Ю. М., Абрамов В. Ю., 1986).

Так как выраженность некоторых реакций иммунной системы контролируются генами системы HLA (Zinkernagel R., 1975), представилось целесообразным проанализировать связь иммунных параметров с наличием HLA-антигенов, частота встречаемости которых была увеличена при ГВО. Были сопоставлены параметры иммунного статуса больных, имеющих в фенотипе HLA-B35, DR2, DR3 с аналогичными показателями больных, в фенотипе которых отсутствует данный HLA-антиген.

У больных, имеющих антиген HLA B35(+) в острую стадию воспаления, отмечалось снижение относительного содержания лимфоцитов ($25,4 \pm 2,8\%$ $p < 0,01$) и сывороточного иммуноглобулина IgG ($13,3 \pm 1,5$ г/л $p < 0,05$), а абсолютное количество нейтрофилов было повышено ($4,7 \pm 0,6 \cdot 10^9$ /л $p < 0,05$). В стадии ремиссии различий иммунного статуса по сравнению с антигеннегативной (B35-) группой не обнаружено. Однако, в группе больных с HLA B35+ выявлена тенденция к более значительному снижению ИРИ ($1,1 \pm 0,2$) и концентрации сывороточных иммуноглобулинов исследуемых классов.

Низкий уровень иммунологических показателей у больных с фенотипом HLA-B35 может быть обусловлен ассоциацией данного антигена с низким содержанием магния в сыворотке крови (Dausset I., Henrotte I. I., 1990), что приводит к снижению выработки интерлейкина 1, интерлейкина 2, интерферона и к более низкой активности факторов комплемента (Каплин Н.Н., 1988, Зайцева Г.А., 1990). В свою очередь это ведет к нарушению распознавания антигена и последующей инициации иммунного ответа для элиминации инфекционного агента.

В группе больных с HLA-антигеном DR2+ по сравнению с группой больных с антигеном DR2- обнаружены более глубокие различия в клеточном звене иммунитета. У больных при наличии в фенотипе HLA-DR2 в острой фазе заболевания снижено количество CD4+ лимфоцитов относительное ($28,3 \pm 1,8\%$ $p < 0,05$), абсолютное ($0,6 \pm 0,1 \cdot 10^9$ /л) и ИРИ ($1,1 \pm 0,1$, $p < 0,05$). В стадии ремиссии основного заболевания восстановление показателей клеточного звена иммунитета в группе DR2 позитивных больных не произошло. Количество CD4+

лимфоцитов и ИРИ CD4/CD8 оставалось на уровне острой фазы воспаления, что ниже, по сравнению с группой DR2 негативных больных. Вероятно, что длительное присутствие в организме чужеродного антигена на фоне вторичного иммунодефицитного состояния, выявленного в наших исследованиях, приводит к развитию хронического воспаления.

В группе DR3 позитивных больных по данным наших исследований в острой фазе заболевания была выявлена тенденция к снижению CD8+ клеток, что сопровождалось достоверным повышением ИРИ CD4/CD8 ($1,4 \pm 0,1$ $p < 0,05$) по сравнению с DR3 негативными больными. Поглотительная способность нейтрофилов была достоверно снижена и составила ($3,3 \pm 0,2$ против $4,1 \pm 0,3$ у HLA-DR- $p < 0,05$). В стадии ремиссии достоверных различий между исследуемыми группами выявлено не было. У DR3 позитивных больных несколько сниженным оставалась субпопуляция CD8+ лф и повышенным ИРИ CD4/CD8, по сравнению с группой больных, не имеющих в фенотипе данный антиген.

Полученные нами результаты предполагают, что развитие хронического воспалительного процесса у больных с HLA – DR3 связано с выраженным подавлением CD8+ лимфоцитов, приводящим к нарушению нормального баланса в соотношении иммунорегуляторных клеток и активизации функций эффекторных клеток к собственным антигенам, чем, по нашему мнению, можно объяснить значительный процент данного антигена в группе больных с осложненным течением травматической болезни. Это согласуется с литературными данными: антиген HLA-DR3 связывают с “высоким” типом иммунного ответа, а риск развития заболевания - с высокой продукцией соответствующих аутоантител (Gyodi E., et al., 1981; Sveigeard A. et al., 1981; Marsh D., 1981).

Более углубленные представления о связи системы HLA с характером течения травмы были получены при исследовании трехлокусного гаплотипа – A11-B35-Cw4. В острой фазе воспаления достоверных различий иммунологических параметров по сравнению с благоприятным течением выявлено не было. Однако в группе больных с гаплотипом A11-B35-Cw4 наблюдается тенденция к снижению основных популяций лимфоцитов: CD3+, CD4+, CD8+, CD22+.

В фазе ремиссии у больных с гаплотипом A11-B35-Cw4 обнаружено снижение по сравнению с благоприятным течением абсолютного количества CD3+ ($0,7 \pm 0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ против $1,1 \pm 0,12 \cdot 10^9/\text{л}$ $p < 0,01$), CD4+ ($0,4 \pm 0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ против $0,68 \pm 0,07 \cdot 10^9/\text{л}$ $p < 0,01$), CD8+ ($0,3 \pm 0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ против $0,51 \pm 0,05 \cdot 10^9/\text{л}$ $p < 0,01$), CD22+ ($0,2 \pm 0,1 \cdot 10^9/\text{л}$ против $0,27 \pm 0,03 \cdot 10^9/\text{л}$ $p < 0,05$) лимфоцитов, свидетельствующее о вовлечении в патологический процесс регуляторных субпопуляций Лф. Уровень сывороточного иммуноглобулина G снижен по сравнению с больными БТТ ($14,5 \pm 0,9$ г/л против $19,82 \pm 1,98$ г/л $p < 0,05$), соответственно.

Таким образом, хроническое течение гнойно-воспалительной инфекции скорее всего связано с гаплотипом, а не с отдельными аллелями, входящими в него. Это свидетельствует в пользу генетической гипотезы опосредования подобных ассоциаций. Не исключено, что гипотетический ген, находящийся в ассоциированном с заболеванием гаплотипе, является IR-геном (Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю., 1986). В этом случае локусы HLA, сцепленные с IR-генами, будут выступать свидетелями ассоциативных связей аллелей локусов IR-генов через функциональные взаимодействия иммунной системы с патологией. В подтверждение этого нами наблюдалось накопление у больных при посттравматических гнойно-воспалительных осложнениях антигенов HLA – DR2, DR3, B35 и уменьшение частоты встречаемости антигенов HLA – B40, DR6.

Полученные данные согласуются также с гипотезой, выдвинутой R. Zinkernagel, 1975, согласно которой в основе патогенеза многих заболеваний лежит нарушение функций Т-клеток, регулируемое антигенами HLA. Реализация их функций может осуществляться разными иммунологическими механизмами и может проявлять свое действие на уровне контроля функций иммунорегуляторных лимфоцитов CD4+, CD8+ через HLA-DR2, HLA-DR3 или регуляции межклеточных взаимодействий посредством медиаторных рецепторов через HLA-B35 (Dausset I, Neurotte I. G., 1990).

ВЫВОДЫ:

1. Характер распределения HLA- антигенов, гаплотипов и параметров неравновесного сцепления аллелей основных популяций РТ имеет преобладающее сходство с европеоидами. Особенностью исследуемой популяции является более высокая частота встречаемости HLA-антигенов В13, В21, В53, Сw2 и сниженная частота HLA- А19, В22, В52, DR4.

2. HLA-антигены могут служить маркерами функционального дисбаланса активности иммунной системы на клинической модели механической травмы. Присутствие в фенотипе HLA-B35 сопряжено со снижением уровня концентрации сывороточного иммуноглобулина IgG. У лиц, имеющих в фенотипе HLA-DR2, снижен уровень CD4+ лф, что приводит к соответствующему снижению иммунорегуляторного индекса (CD4/CD8). У носителей HLA-DR3 отмечено преимущественное падение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов и количества CD8+ лф. Наиболее выраженные изменения иммунологической реактивности у больных с гнойно-воспалительными осложнениями ассоциированы с трехлокусным гаплотипом А11-В35-Сw4.

3. HLA-ассоциированность с характером иммунного ответа сцеплена с идентичными аллелями в обеих популяциях и этнический признак не оказывает существенного влияния на исследуемую взаимосвязь.

4. Тип нарушения иммунного гомеостаза при различных течениях механической травмы детерминирован HLA-антигенами. HLA- В40 и DR6 ассоциированы с благоприятным течением травмы, HLA- А11, В35, DR2, DR3 – с осложненным течением травмы. Повышение абсолютного количества CD8+ лф и снижение ИРИ и сывороточного уровня IgG являются прогностическими критериями неблагоприятного течения травматической болезни.

5. Гаплотипическое и фенотипическое сочетание антигенов: А2-В35; А3-В35; А11-В35; Сw4-DR2; В7-DR3; В35-DR3; А11-DR2; А11-DR3; А11-Сw4-В35-В44; DR2-DR3 повышает риск развития посттравматических осложнений в три и более раз, а сочетание антигенов : А1-DR1; А1-DR5; В49-DR5; В40-DR5

B53- DR5; B39- DR7; B13-Cw3; B44-B13; B62- B18; DR1-DR6 снижает в два и более раз риск развития указанных осложнений.

РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ В ПРАКТИКУ

1. При проведении исследований на отдельных популяциях необходимо соблюдать строгое соответствие групп больных и контрольной группы по этническим признакам. Вследствие генетической близости основных этнических подгрупп исследования на смешанной популяции по проблеме “HLA и болезни” могут быть проведены на обобщенной контрольной группе без учета национальных особенностей.

2. Иммуногенетическое сходство татарской популяции с европеоидами позволяет ожидать достаточно большую трансплантологическую совместимость реципиентов и доноров татарской национальности с реципиентами и донорами Европейской части России и эффективно обмениваться органами с соответствующими трансплантологическими службами России и Европы.

3. Антигены HLA – фенотипа совместно с показателями иммунограммы могут быть использованы как более точные прогностические критерии развития гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде. При наличии антигенов B35, DR, DR3 рекомендуется проведение профилактических мероприятий по предупреждению развития гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде. Особое внимание необходимо уделять обладателям гаплотипа A11-B35-CW4, у которых риск развития ГВО увеличивается в 6,5 раз.

4. Больные с гнойно-воспалительными осложнениями нуждаются в иммунологическом мониторинге. Длительное повышение CD8+ лимфоцитов, снижение ИРИ CD4/CD8 и уровня сывороточного иммуноглобулина G могут служить прогностическим признаком хронизации гнойно-воспалительного процесса.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ

- 1) Тамакова В.П. Распределение HLA антигенов в татарской популяции. // Материалы региональной научно-практической конференции “Современные методы диагностики и лечения”, Нижнекамск, 1994. –С 201-202.
- 2) Тамакова В.П., Ягудина Л.А. Иммунограмма как фактор прогноза гнойно-осложнений у больных с травмой опорно-двигательного аппарата. // Материалы научно-практической конференции “Современные методы диагностики и лечения”, г. Альметьевск, 1993. –С 123-124.
- 3) Ягудина Л.А., Тамакова В.П. Ксимедон в иммунной реабилитации больных с гнойными посттравматическими осложнениями. // Тезисы докладов научной конференции молодых ученых, посвященной 75-летию ГИДУВ, Казань 1995. –С.71-73.
- 4) Тамакова В.П., Ягудина Л.А. HLA-система у больных с послеоперационными посттравматическими гнойно-воспалительными осложнениями. // Тезисы докладов научно-практической конференции молодых ученых. Казань 1997. –С.69-70.
- 5) Тамакова В.П., Цибулькин А.П. Генетические параметры HLA -системы в популяциях Республики Татарстан. //Сб. Республиканская научно-практическая конференция “Актуальные проблемы урологии, нефрологии и заместительной почечной терапии”. Бугульма, 1999. –С.60-68.
- 6) Тамакова В.П., Цибулькин А.П., Галеев Р.Х. Антигены HLA у больных с гнойно-воспалительными осложнениями. //Сб. Республиканская научно-практическая конференция “Актуальные проблемы урологии, нефрологии и заместительной почечной терапии”. Бугульма, 1999. – С.69-71.
- 7) Тамакова В.П., Цибулькин А.П., Галеев Р.Х. Связь антигенов HLA, ассоциированных с ГВО с параметров иммунного статуса. //Сб. Республиканская научно-практическая конференция “Актуальные проблемы урологии, нефрологии и заместительной почечной терапии”. Бугульма, 1999. – С.71-73.

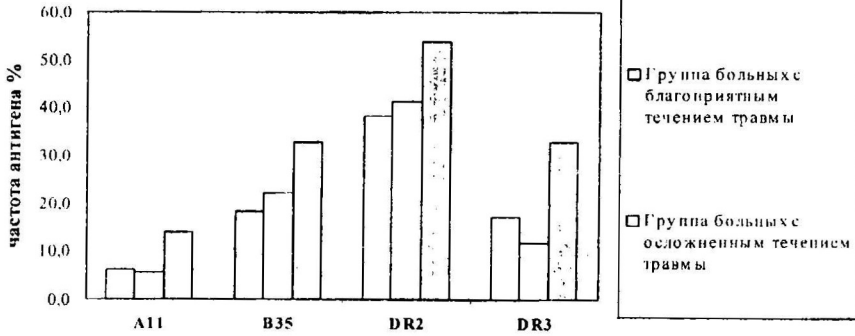


Рис. 1. Распределение HLA-антигенов, ассоциированных с ГВО, в клинических группах при различных течениях травматической болезни

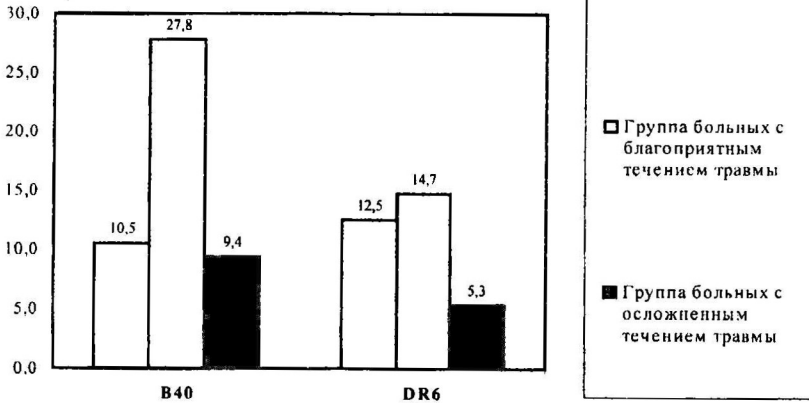
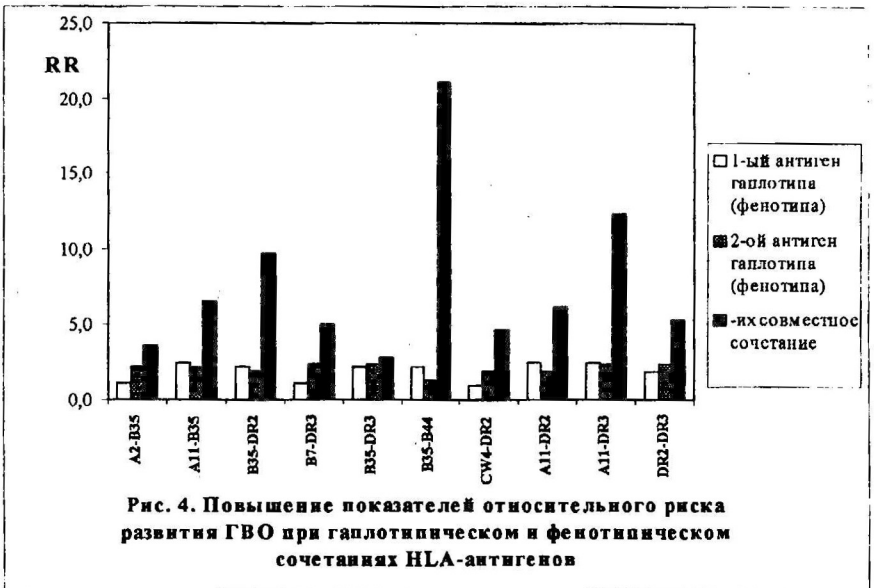
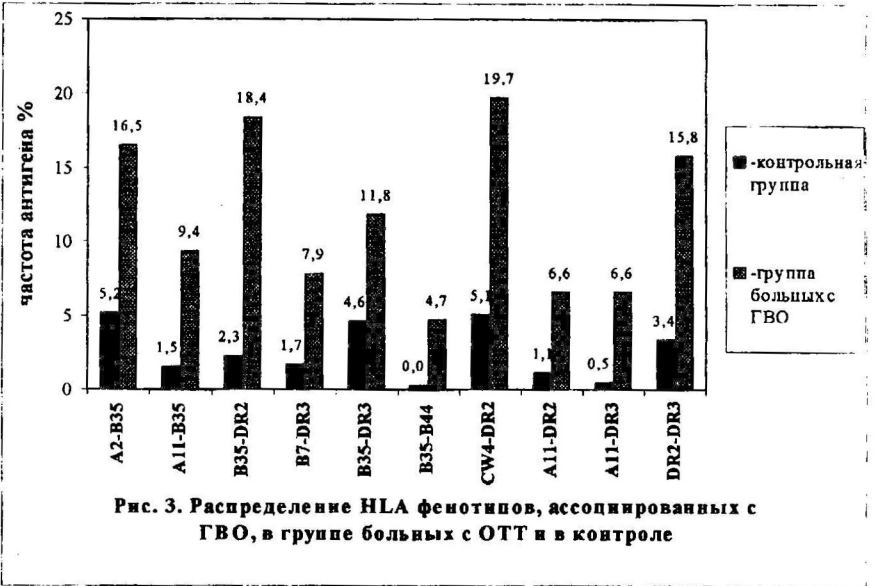


Рис. 2. Распределение HLA-антигенов, резистентных к ГВО, при различных течениях травматической болезни



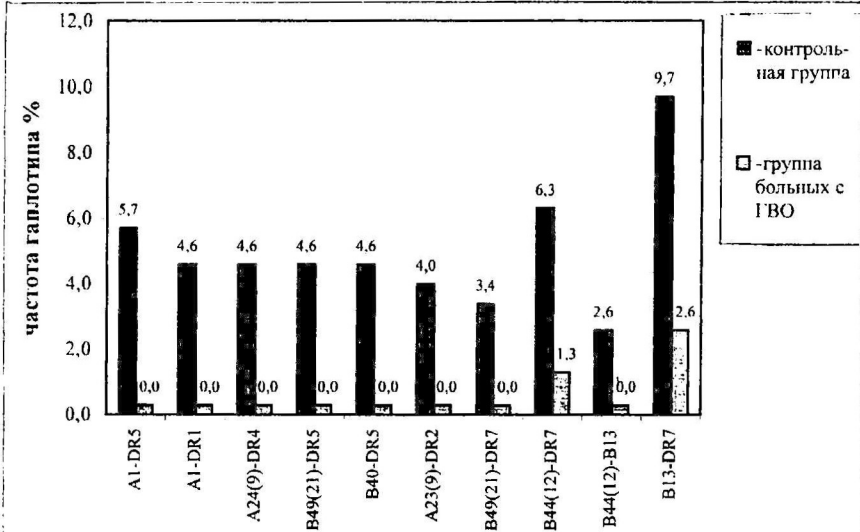


Рис. 5. Распределение HLA фенотипов, резистентных к ГВО, в группе больных с ОТТ и в контроле

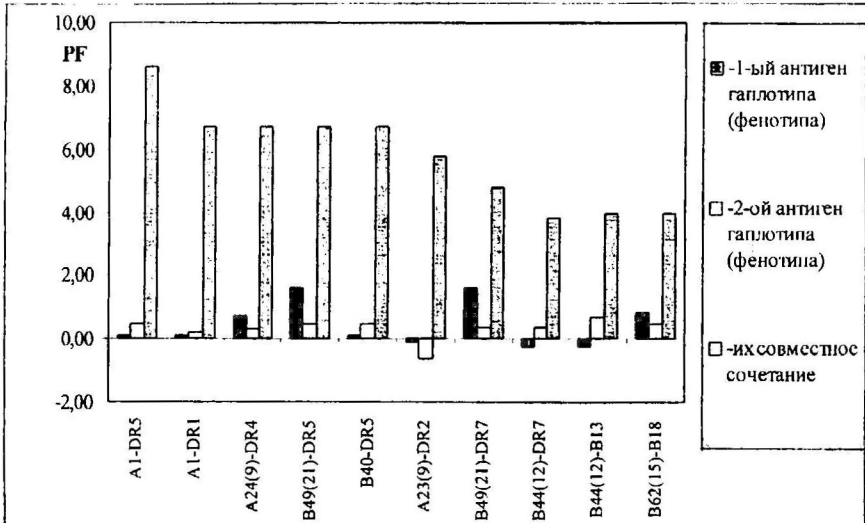


Рис. 6. Повышение значений превентивной фракции (PF) при гаплотипических и фенотипических сочетаниях HLA-антигенов

Лицензия № 0092 от 10.07.97 г.
выдана Министерством информации и печати РТ.

Подписано в печать 11.05.2000 г. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$.
Бумага писчая. Усл. печ. л. 1,63. Уч.-изд. л. 1,0.
Тираж 100 экз. Заказ Т-63.

Отдел оперативной полиграфии РМБИЦ МЗ РТ.
420059 Казань, ул.Хади Такташа, 125

A-00