
ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА HLA-АНТИГЕНОВ ПРИ ПРИОБРЕТЕННОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ У ДЕТЕЙ

А.А. Чумак

Лаборатория HLA-типирования
ГБУЗ «Банк стволовых клеток
Департамента здравоохранения города Москвы»
ул. Бакинская, 31, Москва, Россия, 115541

**Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева, Л.Л. Лебедева,
Т.В. Пухликова**

ГБУЗ «Банк стволовых клеток
Департамента здравоохранения города Москвы»
ул. Бакинская, 31, Москва, Россия, 115541

З.М. Дышлевая, А.Н. Архипова

Отделение гематологии
ФГБУ РДКБ Минздравсоцразвития России
Ленинский проспект, 117, Москва, Россия, 117997

М.М. Азова

Кафедра биологии и общей генетики
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

В статье представлены результаты исследования генетического полиморфизма HLA-антигенов при приобретенной апластической анемии (ПАА) у 147 детей в возрасте от 1 до 18 лет. Контрольная группа была представлена 1700 образцами пуповинной крови условно здоровых новорожденных детей. Анализ полученных данных позволил выявить отличающиеся у детей разного пола и возраста HLA-маркеры предрасположенности и протекции к ПАА. Вероятное различие в факторах иммуногенетической предрасположенности позволяет предположить участие разных механизмов в развитии заболевания у разных групп детей и по-новому рассматривать уже имеющиеся модели патогенеза ПАА.

Ключевые слова: антигены HLA-системы, приобретенная апластическая анемия, дети.

Заболеваемость приобретенной апластической анемией (ПАА) составляет 2—3 случая на 1 млн населения в год в европейских странах и 3—5 случаев на 1 млн населения в год в странах Азии [1]. Около 40 лет назад появились первые результаты исследований распределения антигенов HLA-системы у больных ПАА [2, 3]. В последующие годы исследователями из разных стран было обнаружено увеличение частоты встречаемости HLA-DR2 специфичности у больных ПАА [4, 5] и накоплены сведения о значимости конкретных групп аллелей при возникновении данной патологии. Так, в частности, выявлено, что маркером предрасположенности к развитию заболевания является HLA DRB1*15 [6—8]. Однако, несмотря на попытки изучения генетической предрасположенности к развитию ПАА, данные о роли антигенов HLA в патогенезе заболевания противоречивы и требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования: изучить генетическую предрасположенность к развитию ПАА у детей с учетом иммуногенетических характеристик в зависимости от пола и возраста.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 147 детей с ПАА (85 мальчиков и 62 девочки) в возрасте от 1 до 18 лет, средний возраст составил $11,33 \pm 5,6$ лет. Диагноз ПАА у исследуемой группы был выставлен согласно международным стандартам (British Committee for Standarts in Haematology (BCSH)). Контрольная группа была представлена 1700 образцами пуповинной крови условно здоровых новорожденных детей, родившихся на 37—41-й неделе гестации в г. Москве, прошедших тестирование на вирусную и микробную контаминацию и внесенных в реестр неродственных доноров в г. Москве за период с 2004 по 2009 год [9].

Геномную ДНК выделяли из образцов периферической крови методом сепарации на магнитных частицах. Концентрацию ДНК измеряли против чистого элюирующего раствора по оптической плотности OD260/280 с помощью спектрофотометра SmartSpec Plus фирмы Biorad (США). Образцы для исследования соответствовали предъявляемым требованиям: концентрация ДНК была ≥ 50 нг/мкл, A260/280 составляло 1,7—1,9.

Генотипирование методом гибридизации с помощью олигонуклеотидных зондов применяли для определения генотипа *HLA* по локусам -A, -B, -C, -DRB и DQB1 на уровне групп аллелей. Исследование проводили с использованием полностью автоматического процессора Dynal AutoRELI™ 48 Mk на сертифицированных реагентах RELI™ SSO фирмы «Invitrogen». Считывание и интерпретацию результатов осуществляли с помощью сканирующего устройства и компьютерной программы PMP.

Генотипирование методом ПЦР с помощью аллель-специфических праймеров выполняли на коммерческих сертифицированных наборах ALLSet™GOLD SSP фирмы Invitrogen. Метод включал в себя амплификацию, электрофорез в 2% агарозном геле и интерпретацию результатов. Регистрацию сигналов полученной электрофореграммы и ее документирование в электронном виде осуществляли с помощью гельдокументирующей системы «ДиДжиДок» (США) и компьютерной программы UPV.

Статистическая обработка данных проводилась в программе «Open Epi» (версия 2.3 2009/20/05), с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v. 6.0. Ассоциацию между *HLA* и ПАА выявляли путём сравнения частоты встречаемости антигенов *HLA* системы I и II класса у больных детей и контрольной группе и вычисления следующих показателей: частота встречаемости в долях f , критерий z , критерий χ^2 с поправкой Йейтса, точный двусторонний критерий Фишера; уровень достоверности (p); отношение шансов (OR) с доверительными интервалами 95% (CI).

Результаты и обсуждение. В исследуемой группе больных детей с ПАА и контрольной группе были выявлены следующие группы аллелей: A*01, A*02, A*03, A*11, A*23, A*24, A*25, A*26, A*29, A*30, A*31, A*32, A*33, A*66, A*68, B*07, B*08, B*13, B*14, B*15, B*18, B*27, B*35, B*37, B*38, B*39, B*40, B*41, B*44, B*47, B*48, B*49, B*50, B*51, B*52, B*55, B*56, B*57, C*01, C*02, C*03, C*04, C*05, C*06, C*07, C*08, C*12, C*14, C*15, C*16, C*17, DRB1*01, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*08, DRB1*09, DRB1*10, DRB1*11, DRB1*12, DRB1*13, DRB1*14, DRB1*15, DRB1*16, DQB1*02, DQB1*03,

DQB1*04, DQB1*05, DQB1*06. Проведенные исследования показали, что характер распределения частоты встречаемости групп аллелей HLA класса I и II в обеих группах в целом соответствовал таковому у европеоидов.

При изучении распределения частоты встречаемости аллельных групп HLA в контрольной группе зависимости от пола обнаружено не было. В группе девочек, больных ПАА, отмечалось достоверное увеличение частоты встречаемости групп аллелей HLA DRB1*15 и DQB1*06 и снижение частоты встречаемости В*38 и DRB1*01. В группе мальчиков с ПАА по сравнению с контрольной группой отмечалось достоверное увеличение частоты встречаемости групп аллелей А*01, В*08, В*40, DRB1*03, DRB1*15 DQB1*06 и снижение частоты встречаемости В*44, С*06, DRB1*04, DRB1*07.

Согласно данным, представленным в табл. 1, у девочек наличие DRB1*15 и DQB1*06 увеличивает риск развития ПАА в 2,74 и 2,86 раза, соответственно, в то время как минимальный риск ассоциирован с наличием группы аллелей В*38. У мальчиков выявлено большее, чем у девочек, количество маркеров предрасположенности к развитию ПАА, что, возможно, объясняет и более высокую частоту заболеваемости ПАА в этой группе [10]. Группы аллелей HLA DRB1*15 и DQB1*06 оказались общими для девочек и мальчиков маркерами предрасположенности. Однако риск развития ПАА у мальчиков — носителей DRB1*15 и DQB1*06 был ниже, чем у девочек.

Таблица 1

Иммуногенетические факторы предрасположенности и протекции к развитию ПАА у детей, $p < 0,05$

Группа аллелей HLA	Девочки (n = 62)		Девочки младше 14 лет (n = 40)		Девочки старше 14 лет (n = 22)		Мальчики (n = 85)		Мальчики младше 14 лет (n = 52)		Мальчики старше 14 лет (n = 33)	
	OR	CI	OR	CI	OR	CI	OR	CI	OR	CI	OR	CI
A*01	—	—	—	—	—	—	1,75	1,06—2,86	—	—	—	—
B*08	—	—	—	—	—	—	2,22	1,27—3,77	2,53	1,24—4,93	—	—
B*14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*38	0	0,001—0,75	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B*40	—	—	—	—	—	—	2,19	1,14—4,01	2,7	1,23—5,75	—	—
B*44	—	—	—	—	—	—	0,36	0,14—0,79	0,2	0,03—0,71	—	—
B*51	—	—	3,31	1,3—7,57	—	—	—	—	—	—	3,37	1,09—8,85
C*06	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0,3	0,093—0,80	n/a	n/a	n/a	n/a
DRB1*01	0,35	0,12—0,84	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
DRB1*03	—	—	—	—	—	—	2,29	1,39—3,77	2,85	1,5—5,2	—	—
DRB1*04	—	—	—	—	0	0,001—0,67	0,4	0,181—0,82	—	—	0,13	0,02—0,8
DRB1*07	—	—	—	—	—	—	0,4	0,2—0,74	0,3	0,1—0,739	—	—
DRB1*15	2,74	1,59—4,72	3,32	1,66—6,67	—	—	2,29	1,45—3,62	—	—	4,18	1,97—9,07
DQB1*06	2,86	1,54—5,51	2,47	1,17—5,42	n/a	n/a	1,69	1,01—2,82	—	—	n/a	n/a

Примечание: n/a — not available.

С протекцией к развитию ПАА у мальчиков ассоциированы В*44, С*06, DRB1*04 и DRB1*07.

Для выявления возрастных различий в частоте встречаемости групп аллелей HLA у детей с ПАА пациенты были разделены на 2 группы: больные ПАА младше 14 лет ($n = 92$, из них 52 мальчика и 40 девочек, средний возраст $8,1 \pm 3,35$) и больные ПАА старше 14 лет ($n = 55$, из них 33 мальчика и 22 девочки, средний возраст $15,6 \pm 1,98$).

У девочек, больных ПАА, младше 14 лет наблюдалось накопление групп аллелей В*51, DRB1*15 и DQB1*06, с увеличением риска развития ПАА у носителей В*51 или DRB1*15 более чем в 3 раза. У больных мальчиков младше 14 лет отмечено достоверное увеличение частоты встречаемости В*08, В*40 и DRB1*03 и снижение частоты встречаемости В*44, DRB1*07. Следовательно, наличие В*08, В*40 и DRB1*03 в генотипе ассоциировано с высоким риском развития ПАА у мальчиков младше 14 лет (табл. 1). У девочек с ПАА старше 14 лет было обнаружено достоверное снижение частоты встречаемости HLA DRB1*04 в то время, как у мальчиков с ПАА старше 14 лет отмечалось достоверное увеличение частоты встречаемости В*51 и DRB1*15 и снижение частоты встречаемости HLA DRB1*04 по сравнению с контрольной группой. Оказалось, что наличие DRB1*15 в генотипе увеличивает риск развития ПАА в этой возрастной группе мальчиков более чем в 4 раза.

Группа аллелей DRB1*04 характеризуется отрицательной ассоциацией с развитием ПАА у мальчиков и девочек старше 14 лет.

Различия маркеров предрасположенности и протекции к развитию ПАА в зависимости от пола и возраста позволяют предполагать, что в развитии ПАА у мальчиков и девочек в определенные возрастные периоды принимают участие разные патогенетические механизмы, которые, в свою очередь, вовлекают в процесс разные иммуногенетические факторы.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о необходимости изучения генетического полиморфизма HLA-системы не только в отношении заболевания в целом, но и в группах больных в зависимости от пола и возраста. В связи с тем, что выявленные HLA-маркеры предрасположенности к развитию ПАА могут увеличивать риск только у определенных групп детей и не влиять на развитие данной патологии у остальных, перспективным направлением представляется также исследование генетического полиморфизма HLA-антигенов у больных с разными клиническими формами и разной степенью тяжести заболевания. Вероятное различие в факторах иммуногенетической предрасположенности позволяет предположить участие разных механизмов в развитии заболевания у разных групп в популяции и по-новому рассматривать уже имеющиеся модели патогенеза ПАА.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Young N. S., Kaufman D.W. The epidemiology of acquired aplastic anemia // *Haematologica*. — 2008. — Vol. 93. — P.489.
- [2] Albert E., Thomas E.D., Nisperos B. et al. HLA antigens and haplotypes in 200 patients with aplastic anemia // *Transplantation*. — 1976. — Vol. 22. — P. 528—531.
- [3] Dausset J., Svejgaard A. HLA and Disease. — Copenhagen: Munksgaard, 1977. — P. 84—93.

- [4] *Chapuis B., Von Flidner V.E., Jeannet M. et al.* Increased frequency of DR2 in patients with aplastic anaemia and increased DR sharing in their parents // *Br J Haematol.* — 1986. — Vol. 63(1). — P. 51—57.
- [5] *Канустин С.И.* Особенности аллельного полиморфизма генов HLA II класса в здоровой популяции Санкт-Петербурга и у больных тяжелой апластической анемией: Дисс. ... канд. биол. наук. — СПб., 1998.
- [6] *Nakao S., Takamatsu H., Chuhjo T. et al.* Identification of a specific HLA class II haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporine-dependent aplastic anemia // *Blood.* — 1994. — Vol. 84(12). — P. 4257—4261.
- [7] *Sauntharajah Y., Nakamura R., Nam J.M. et al.* HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome // *Blood.* — 2002. — Vol. 100. — P. 1570—1574.
- [8] *Dhaliwal J.S., Wong L., Kamaluddin M.A. et al.* Susceptibility to aplastic anemia is associated with HLA-DRB1*1501 in an aboriginal population in Sabah, Malaysia // *Hum Immunol.* — 2011. — Vol. 72(10). — P. 889—892.
- [9] *Лебедева Л.Л.* Генетический полиморфизм антигенов гистосовместимости здорового детского населения Московского региона и при острых лейкозах у детей: Дисс. ... канд. биол. наук. — М., 2010.
- [10] Incidence of aplastic anemia: the relevance of diagnostic criteria. By the International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study // *Blood.* — 1987. — Vol. 70(6). — P. 1718—1721.

THE CHARACTERISTICS OF GENETIC POLYMORPHISM OF HLA-ANTIGENS IN ACQUIRED APLASTIC ANEMIA IN CHILDREN

A.A. Chumak, T.A. Astrelina, M.V. Yakovleva,

L.L. Lebedeva, T.V. Pukhlikova

Department of Health of the City of Moscow

HLA-typing laboratory

GBUZ “Stem cell bank”

Bakinskaya str., 31, Moscow, Russia, 115541

Z.M. Dishlevaya, A.N. Arkhipova

Department of Hematology № 1

FSBI RCCH Health Ministry of Russia

Leninsky av., 117, Moscow, Russia, 117997

M.M. Azova

Department of Biology and General Genetics

Peoples' Friendship University of Russia

Miklukho-Maklay str., 8, Moscow, Russia, 117198

This study presents the genetic polymorphism of HLA-antigens in acquired aplastic anemia (AAA) in 147 children (85 boys and 62 girls) aged 1 to 18 with. The control group is consisted of 1700 umbilical cord blood samples of healthy newborns. The genetic polymorphism of HLA was studied in groups of children with AAA, divided by gender and age. Our results revealed distinction in HLA-markers of predisposition and sustainability to AAA. Possible differences in factors of immunogenetic predisposition suggest different mechanisms involved in the development of the disease in different groups of children and reconsider the existing model of the pathogenesis of AAA.

Key words: HLA-antigens, acquired aplastic anemia, children.