

гемофілію А. Висновки. Зміни в генах системи HLA можуть бути причиною появи ускладнень, зокрема імунних інгібіторів у хворих на гемофілію А.

Ключові слова: гемофілія А, інгібітор, HLA- генотипування.

АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 У БОЛЬНЫХ ГЕМОФИЛИЕЙ А

О.В.Стасишин¹, О.И. Терпыляк², В.В. Красивская¹, Г.В. Макух²

¹ДУ «Институт патологии крови и трансфузионные медицины НАМН Украины»,
Львов

²ДУ «Институт наследственной патологии НАМН Украины», Львов

Резюме. Проанализированы особенности аллельных полиморфизмов генов HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 II класса МНС человека у 47 больных гемофилией А, из них у 12 больных гемофилией А, у которых не развивался ингибитор. Методы. Активность фактора VIII по унифицированной одностадийной методике. Качественный (скрининговый) тест на наличие ингибитора фактора VIII на основе АЧТВ; количественное определение активности ингибитора к фактору VIII – по методике Casper (1975). Выделение ДНК высаливанием, ПЦР, электрофорез в агарозном геле. Результаты. Проведен комплексный анализ распределения и частоты аллельных вариантов генов HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 у больных гемофилией А. Выводы. Изменения в генах системы HLA могут быть причиной появления осложнений, в частности иммунных ингибиторов у больных гемофилией А.

Ключевые слова: гемофилия А, ингибитор, HLA-генотипирование.

THE DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS OF GENES HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 IN HEMOPHILIA A PATIENTS

O.V. Stasyshyn¹, O.I. Terpylyak², V.V. Krasivska¹, G.V. Makuch²

¹SI "Institute of Pathology of blood and of tranfusion medicine of NAMS of Ukraine",
Lviv

²SI "Institute of Hereditary Pathology of NAMS of Ukraine", Lviv

Summary. The features allelic polymorphisms of genes HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 II-class MHC in 47 patients with haemophilia A, including 12 patients with haemophilia A, which did not develop inhibitor. Methods. Factor VIII for uniform one-step method. Screening test for an inhibitor factor VIII based on the APTT; activity of the inhibitor to factor VIII – Bethesda method. Salting-out DNA isolation, PCR, electrophoresis in agarose gels. Results. A comprehensive analysis of the distribution and frequency of allelic variants of genes HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 in patients with haemophilia A has been performed. Conclusions. Changes in genes HLA system can cause complications, including immune inhibitors in patients with haemophilia A.

Key words: haemophilia A, inhibitor, HLA-genotyping.

Гемофілія А – це найбільш поширений важкий розлад коагуляції у чоловіків, обумовлений відсутністю або порушенням активності фактора згортання VIII (FVIII) в результаті різноманітних мутацій гена FVIII [4, 6, 8]. Поширеність цього захворювання становить 1 на 10000 новонароджених хлопчиків або 100 на 1 млн. населення і рівномірно розподілена у всіх расових та етнічних групах. В Україні на даний час зареєстровано близько 2500 хворих на гемофілію А. Основним методом лікування є пожиттєва замісна трансфузійна терапія препаратами, які містять FVIII. Але, на жаль, у частини хворих, за даними різних авторів – від 15 до 35%, – виникають імунні інгібітори у відповідь на введений FVIII, що призводить до розвитку резистентності до замісної трансфузійної терапії [3-5]. Причини появи інгібітору до кінця не з'ясовані. В численних дослідженнях доведено, що фактором ризику є тип та тяжкість генетичної мутації FVIII, зокрема великі делеції, місенс мутації, інтрон 22 інверсія частіше призводять до розвитку інгібітору [2, 3, 5, 7, 9]. До генетичних факторів ризику також відносять алелі генів основного комплексу гістосумісності (МНС) I та II класу і поліморфізми генів цитокінів [3-5, 7, 9].

Метою нашого дослідження було визначити генетичні особливості алелей HLA класу II у хворих на гемофілію А, зокрема з неускладненою гемофілією А, порівнюючи із загальнопопуляційними показниками.

Матеріали і методи досліджень. В дослідження були включені 47 пацієнтів з гемофілією А, чоловіки, віком від 3 до 65 років, які знаходяться на диспансерному обліку в ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України», м. Львів і проживають у Південно-Західному регіоні України. З них: у 33 пацієнтів було діагностовано тяжку форму гемофілії А (рівень FVIII < 1,0%), в 11 – форму середньої тяжкості (рівень FVIII – 1,1–5,0%) та у 3 – легку форму (рівень FVIII 5,1–10,0%). Контрольну групу склали 34 здорові чоловіки –донори, віком від 25 до 46 років.

Визначення активності дефіцитного FVIII проводили за уніфікованою одностадійною методикою і виражали у відсотках від його вмісту у нормальній плазмі. Якісний (скринінговий) тест на наявність інгібітору фактора згортання проводили на основі активованого часткового тромбoplastинового часу (АЧТЧ); кількісне визначення активності інгібітору до FVIII (IX) проводили за методикою Kasper (1975) і виражали в Бетезда од/мл (БО/мл) [6].

Досліджено ДНК, виділену з лейкоцитів периферичної крові методом висолювання. Генотипування DRB1, DQA1 та DQB1 проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на термоциклері «Герцик» («ДНК-технологія», РФ) в автоматичному режимі за

відповідною програмою. Для типування алелів зазначених генів використано набір реагентів «GenPak HLA- DRB1 PCR test», «GenPak HLA- DQA1 PCR test» «GenPak HLA- DQB1 PCR test» (ООО «Лаборатория Изоген, РФ) Набори реагентів, призначених для ампліфікації ДНК методом ПЛР з сиквенс-специфічними праймерами. Алелі детектували електрофорезом в 3%-му агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм в УФ-світлі за довжини хвилі 302 нм.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням критерію Пірсона χ^2 . Для всіх видів аналізу критичний рівень значущості для статистичних критеріїв приймали як $p < 0,05$. Асоціацію генотипів та алелів з ризиком інгібітору оцінювали, розраховуючи коефіцієнт шансів (Odds ratio, OR) з 95%-м довірчим інтервалом.

Результати та їх обговорення. Враховуючи позаклітинний характер антигену екзогенно введеного FVIII виникає особливий інтерес для вивчення ролі алелей HLA класу II у формуванні інгібітору. Дослідження показали, що деякі алелі HLA класу II пов'язані з високим ризиком утворення інгібітору, в той час як інші – можуть бути захисними [2, 7].

Ми провели аналіз алелей генів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 II-го класу МНС людини у 47 хворих на гемофілію А, з них у 12 хворих на гемофілію А, в яких не розвивався інгібітор, порівняно з контрольною групою з 34 здорових чоловіків – донорів середнього віку, які проживають у Львівській області. Досліджено 16 алелів гена HLA DRB1, 10 алелів гена HLA DQA1 та 19 алелів гена HLA DQB1.

У хворих на гемофілію А спостерігається збільшення частоти DRB1*1101-1104 вдвічі порівняно з контрольною групою (19,5% проти 10,29% ($\chi^2=2,371$, $p > 0,05$), збільшення частоти DQB1*0302 (12,77% проти 5,88%, $\chi^2=2,10$, $p > 0,05$); зменшення частоти DRB1*0701-0702 (12,77% проти 23,53%, $\chi^2=3,197$, $p > 0,05$), DQA1*0201 (12,77% проти 22,06, $\chi^2=2,45$, $p > 0,05$) та відсутність у хворих алелі DRB1*1201-1202 ($\chi^2=2,799$, $p > 0,05$).

Таким чином, розподіл алелей генів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 II класу МНС людини у групі хворих на гемофілію, в цілому, не відрізняється від розподілу цих генів в популяції чоловіків цього ж регіону. Тобто не виявлено впливу генів II-го класу МНС на виникнення захворювання гемофілії А.

Ми також проаналізували розподіл генів у 12 хворих на гемофілію А, в яких ніколи не виявлявся інгібітор FVIII, порівняно з контрольною групою (табл. 1).

**Розподіл алелей генів II класу MHC
у хворих на гемофілію А без інгібітору**

Алелі	Хворі без інгібітору (12 чоловіків; 24 алеля)		Чоловіки контрольної групи (34 чоловіки; 68 алелей)		χ^2	p
	n	Частота, %	n	Частота, %		
DRB1 *1601-1602	3	12,50	2	2,94	3.154	<0.05
DRB1 *0701-0702	1	4,17	16	23,53	4.415	<0.05
DQA1*0201	1	4,17	15	22,06	3.953	<0.05
DQA1*0301	5	20,83	6	8,82	2.431	>0.05
DQB1 *0302	8	33,33	4	5,88	11.78 6	<0.05

Одержані результати показали інший (відносно контролю) розподіл частот алельних варіантів досліджуваних генів у групі хворих з неускладненою гемофілією А. Зокрема в межах локусу DRB1 встановлено підвищену (у порівнянні з контрольними показниками) частоту алелі DRB1*1601-1602 (12,5% проти 2,94%) та знижену (стосовно контролю) частоту алелі DRB1*0701-0702 (4,17% проти 23,53%). В межах локусу DQA1 в групі хворих на неускладнену гемофілію А підвищеною виявилася частота DQA1*0301 (20,83% проти 8,82% у контролі) та суттєво зниженою – частота DQA1*0201 (4,17% проти 22,06% у контрольній групі). Для локусу DQB1 у групі хворих з неускладненою гемофілією частота алеля DQB1 *0302 становить 33,33% , що суттєво більше, ніж у донорів (5,88%).

Статистичне опрацювання результатів дозволило виокремити алелі, асоційовані з неускладненою гемофілією А. Як видно з табл. 1, вірогідно значуще підвищення частоти встановлено для алеля DRB1*1601-1602, ($\chi^2= 3.154$, $p < 0.05$), а вірогідно значуще зниження частоти для алеля DRB1*0701 0702 ($\chi^2= 4.415$, $p<0.05$). Алель DQA*0201 виявилася вірогідно зниженою ($\chi^2= 3.953$, $p<0.05$), а алель DQB1 *0302 вірогідно збільшеною ($\chi^2= 11,786$, $p<0.05$, CI 8(2.14 – 29.93)). Тобто алель DRB1*1601-1602 та DQB1 *0302 можна розглядати як алель протектор, а алелі DRB1*0701-0702 та DQA*0201 – як алель – агресор відносно розвитку імунних інгібіторів у хворих на гемофілію, що, в цілому, відповідає даним інших дослідників [4,5,8].

Висновки

1. Проведено комплексний аналіз розподілу та частоти алельних варіантів генів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 II класу МНС людини у хворих на гемофілію А. Встановлено, що, розподіл алелей генів HLA-DRB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1 II класу МНС людини у хворих на гемофілію, в цілому, не відрізняється від розподілу цих генів в популяції чоловіків цього ж регіону, тобто гени II-го класу МНС не впливають на виникнення захворювання гемофілією А.

2. Встановлено, що DRB1*1601-1602 та DQB1*0302 є алелями протекторами, тобто захищають від появи інгібітору у хворих на гемофілію А, а алелі DRB1*0701-0702 та DQA*0201 можуть бути алелями-агресорами, що потребує подальшого вивчення у більшій кількості хворих.

Література

1. Патент RU 2469 322 C1, МПК G01N 33/48. Способ прогнозирования риска развития ингибиторной формы гемофилии / Г. А. Зайцева, Е. П. Ивашкина, С. А. Ситников, С. И. Ворожцова // Опубл. 10.12.2012. Бюл. № 34.

2. HLA class II profile: a weak determinant of factor VIII inhibitor development in severe haemophilia A / CR Hay, W Ollier, L Pepper [et al.]// UKHCDO Inhibitor Work- ing Party. Thromb Haemost. – 1997. – Vol.77. – P. 234–7.

3. HLA class II genotype and factor VIII inhibitors in mild haemophilia A patients with an Arg⁵⁹³ to Cys mutation / W. S. Brill, P. E. Maclean, P. H. P. Kaijen [et al.]// Haemophilia. – 2004, Vol. 10. – P. 509–514.

4. Impact of HLA alleles and cytokine polymorphisms on inhibitors development in children with severe haemophilia A / H. Pergantou, I. Varela, O. Moraloglou [et al.]// Haemophilia. – 2013. Vol. 19. – P. 706–710.

5. Importance of immune response genes in hemophilia A / J. B de Alenca, L C. Macedo, M F de Barros [et al.]// Rev Bras Hematol Hemoter. – 2013. – Vol. 35(4). – P. 280–286.

6. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders. A laboratory manual. Second Edition / S. Kitchen, A. McCraw, M. Echenagucia // – Canada, Montreal: World Federation of Hemophilia (WFH). – 2010. – 144 p.

7. Genetic risk factors for inhibitors to factors VIII and IX. / J. Oldenburg, A. Pavlova. // Haemophilia. – 2006. – Vol. 12 (Suppl. 6). – P. 15–22.

8. MHC class II proteins and disease: a structural perspective / E.Y. Jones, L. Fugger, J.L. Strominger, C. Siebold // Nat. Rev. Immunol. – 2006. – Vol. 6. – P. 271–282.

9. The Association Between HLA Class II Alleles and the Occurrence of Factor VIII Inhibitor in Thai Patients with Hemophilia A / O. Nathalang, P. Sriwanitchrak, W. Sasanakul, A. Chuansumrit // Turk J Hematol. – 2012. – Vol. 29. – P. 3.