

В.В. Маврутенков

РОЛЬ DRB1-ЛОКУСУ ГІСТОСУМІСНОСТІ ЛЮДИНИ У ФОРМУВАННІ ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ПРИ ГЕРПЕСВІРУСНІЙ ІНФЕКЦІЇ ТИПУ (ЕПШТЕЙНА-БАРР)

Дніпропетровська державна медична академія

*Предметом дослідження є поліморфізм генів DRB1-локусу HLA класу II в осіб з різними клінічними варіантами інфекції, спричиненої вірусом Епштейна-Барр (ВЕБ). З цією метою за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) було проведено типування нуклеотидної послідовності генів DRB1-локусу, а також ДНК ВЕБ, які отримані з лімфоцитів периферичної крові. У результаті досліджень було показано, що алель DRB1*04 – ген-протектор, який забезпечує субклінічний перебіг інфекції та пригнічення персистенції ДНК ВЕБ у лімфоцитів периферичної крові. Люди, які мають алелі DRB1*13 (06) та DRB1*16, є найбільш вразливими щодо розвитку інфекційного мононуклеозу і лімфопроліферативних захворювань, що асоціюються з ВЕБ-інфекцією.*

*Алель DRB1*13 (06) є предикатом схильності до персистенції ДНК ВЕБ у лімфоцитів периферичної крові. Наявність у DR-локусі II класу HLA алелі DRB1*07 вказує на високий ризик виникнення тромбцитопенії в умовах ВЕБ-інфікування.*

ВЕБ-інфекція – це антропонозне захворювання з родини Herpesviridae [1-3]. Убіквітарність поширення, масовість інфікування і схильність ВЕБ до персистенції ставлять перед лікарем два основних питання. По-перше, чи дійсно виявлена патологія обумовлена ВЕБ-інфекцією? І, по-друге, чому ВЕБ-інфекція, опортуністична по суті, маніфестувала і чим це загрожує пацієнту? Якщо в першому випадку клініцист зможе одержати відповідь завдяки наявності в лабораторному арсеналі імунологічних і молекулярно-генетичних досліджень, то друге питання в більшості випадків залишається невирішеним. З позиції етіології причини маніфестації інфекції не зрозумілі, тому що ВЕБ має два типи: А і В, які між собою клінічно не розрізняються [4, 5]. Найбільш ймовірно розмаїтість клінічних проявів (від інпаарантних форм

до В-лімфом), насамперед, визначається імуногенними властивостями людського індивідуума. Як відомо, сила і характер імунної відповіді зумовлені генами головного комплексу гістосумісності (ГКГ) і, насамперед, специфічностями DR-локусу II класу. Нині вже відомо біля сотні інфекційних і соматичних захворювань, що мають генетичну основу [6]. Таким чином, установлення конкретних імуногенних факторів, що визначають перебіг інфекційного процесу, є новим аспектом у розумінні патогенезу ВЕБ-інфекції.

Метою роботи було вивчення поліморфізму DRB1-локусу II класу ГКГ в осіб із захворюваннями, що асоціюються з ВЕБ-інфекцією.

Матеріали і методи

У дослідженні взяли участь 55 осіб віком від 1 до 37 років, серопозитивних щодо ВЕБ-інфекції. За етнічним складом вся когорта спостереження була представлена тільки українцями або росіянами, які є домінуючими націями, що проживають на території Наддніпрянщини. Усі пацієнти були розділені на п'ять груп залежно від клінічного статусу: I група (n=14) – клінічно здорові «ВЕБ-позитивні» особи; II (n=11) – хворі на типовий інфекційний мононуклеоз (ІМ); III (n=16) – пацієнти з неспецифічною лімфаденопатією (НЛА); IV (n=7) – діти, хворі на лімфогранулематоз (ЛГМ), і V група (n=7) – діти з гострою тромбцитопенією (ГТ).

Типування алелей DRB1-локусу II класу ГКГ проводилося методом ПЛР із ДНК лейкоцитів периферичної крові. У роботі використовували комерційні набори фірми «ДНК-технологія» (Москва, РФ), що дозволяють ідентифікувати 14 специфічностей DRB1-локусу II класу ГКГ. При цьому варто звернути увагу на те, що деякі алелі створюють так звані «широки» специфічності унаслідок перехресного реагування. У таких випадках «широкі» специфічності приводилися поряд у дужках. Як загальну популяцію, що характеризує розподіл генів DRB1-локусу II класу ГКГ серед жителів Наддніпрянщини, використовувалися дані лабораторії клінічної імуногенетики

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

відділення хронічного гемодіалізу і трансплантації нирок обласної клінічної лікарні ім. І.І. Мечникова (м. Дніпропетровськ).

Клінічний діагноз у кожній групі спостереження підтверджували лабораторними, інструментальними, а за необхідності – й морфологічними дослідженнями залежно від характеру захворювання. Верифікація ВЕБ-інфекції ґрунтувалася на виявленні в сироватці крові противірусних антитіл: до капсидного (VCA-IgM), раннього (EA-IgG) і ядерного (ЕВNA-IgG) антигенів збудника методом імуноферментного аналізу (ІФА). Крім того, було проведено виділення ДНК ВЕБ з лейкоцитів периферичної крові методом ПЛР, для чого використовували ампліфикаційні тест-системи фірми «Амплісенс» (Москва, РФ). Технічне виконання досліджень методом ПЛР здійснено у відділі молекулярно-генетичних досліджень (к.б.н. Т.В. Маврутенковою) діагностичного центру Дніпропетровської медичної академії.

Отримані дані оброблені за допомогою пакету програм статистичного аналізу *STATISTICA 5.0*. Вірогідність відмінностей показників оцінювали з використанням точного критерію Фішера і критерію Хі-квадрат Пирсона (2). Для оцінки ступеня ризику виникнення захворювання розраховували показник «відношення шансів» (ВШ, odds ratio) [7]:

$$ВШ = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

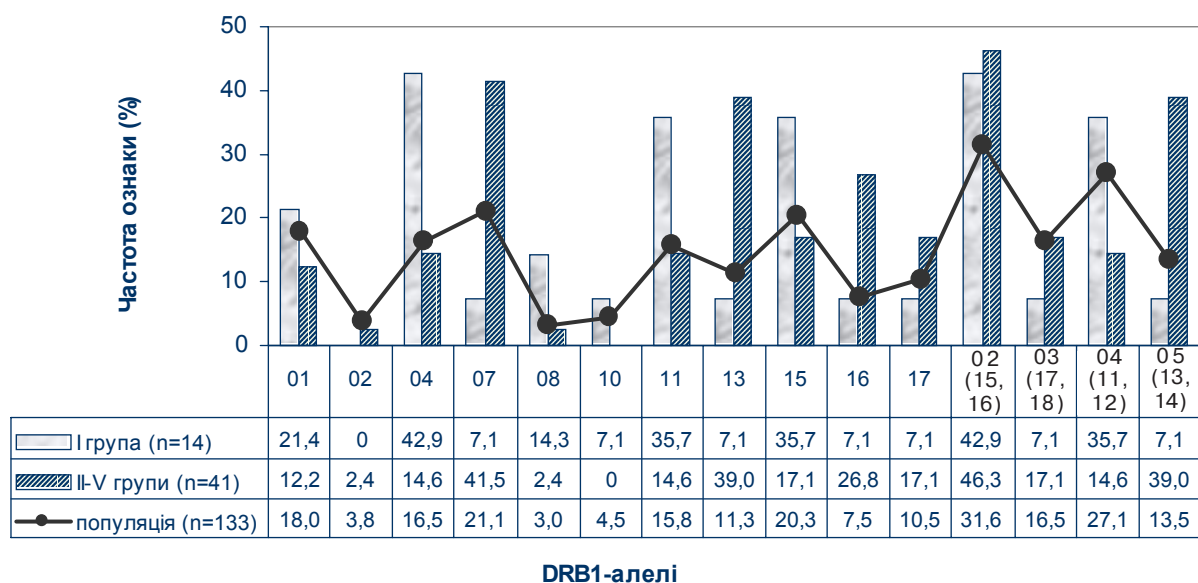
де а – основна група з наявністю ефекту (ознаки), b – контрольна група з наявністю ефекту, с – відсутність ефекту в основній групі, d – відсутність ефекту в контрольній групі.

Значення ВШ від 0 до 1 відповідає зниженню ризику; при показниках ВШ, рівних 1, розбіжностей немає, тоді як ВШ, що перевищує 1, вказує на підвищений ризик захворювання.

Результати досліджень та їх обговорення

Результати досліджень, наведені на малюнку 1, свідчать про те, що клінічно здорові «ВЕБ-серопозитивні» особи вірогідно частіше, ніж пацієнти з ВЕБ-асоційованою патологією, мали специфічність DRB1*04 (P<0,05). Таким чином, цю алель слід розглядати як ген резистентності стосовно виникнення ІМ і асоційованих з ним патологій. Цікаво відзначити, що специфічність DRB1*04 є генетичним предикатом виникнення таких захворювань, як ревматоїдний артрит і цукровий діабет [6]. У зв'язку з цим слід більш виважено поставитися до ролі інфекції ВЕБ як можливого тригера зазначених захворювань. Крім того, привертає увагу той факт, що в зазначеній групі частіше, ніж у пацієнтів з ВЕБ-асоційованою патологією, траплялися алелі DRB1*11 (P=0,12) і DRB1*15 (P=0,26). Якщо підсумувати частки трьох вищевказаних специфічностей у загальній популяції, то виявиться, що 52,6 % людей, можливо, переносять ВЕБ-інфекцію у субклінічній формі.

Аналіз даних імуногенетичних досліджень пацієнтів у групах, що залишилися, показав наступне. У хворих з лімфопроліферативним синдромом (II, III та IV групи) загальним геном схильності є специфічність DRB1*13 (06), P<0,05 (табл. 1). При цьому у власників цієї алелі показник ВШ виникнення однієї з розглянутих патологій коливався від 6 до 17 разів. Іншим за значимістю геном схильності у хворих на ІМ і НЛА є специфічність DRB1*07 (P<0,1), а в хворих з ЛГМ – алель DRB1*16 (P<0,05).



Мал. 1. Розподіл генів ГКГ у групах спостереження і генеральній популяції.

Розподіл генів ГКГ у різних групах носіїв ВЕБ-інфекції

DRB1-алелі	I група (n=14)		II група (n=11)		III група (n=16)		IV група (n=7)		V група (n=7)	
	%	ВШ	%	ВШ	%	ВШ	%	ВШ	%	ВШ
01	21,4	0,0	0	0,0	18,8	0,9	14,3	0,6	14,3	0,6
04	42,9	0,3	18,2	0,3	18,8	0,3	14,3	0,2	0*	0,0
07	7,1	7,4	36,4 [#]	31,3 [#]	5,9	28,6	5,2	85,7*	78,0	
08	14,3	0,6	9,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
11	35,7	0,2	9,1	6,3*	0,1	14,3	0,3	42,9	1,4	
13	7,1	15,6	54,5*	31,3 [#]	5,9	57,1*	17,3	14,3	2,2	
15	35,7	0,4	18,2	25,0	0,6	14,3	0,3	0,0 [#]	0,0	
16	7,1	4,9	27,3	25,0	4,3	42,9*	9,8	14,3	2,2	
17	7,1	4,9	27,3	25,0	4,3	0	0,0	0	0,0	
02 (15,16)	42,9	1,1	45,5	45,5	1,1	57,1	1,8	28,6	0,5	
03 (17,18)	7,1	4,9	27,3	27,3	4,9	0	0,0	0	0,0	
05 (11,12)	35,7	0,2	9,1	9,1	0,2	14,3	0,3	42,9	1,4	
06 (13,14)	7,1	15,6	54,5*	54,5*	15,6	57,1*	17,3	14,3	2,2	

Примітка. * (#) – $P < 0,05$ ($P < 0,1$) порівняно з I групою.

Слід зазначити, що при ІМ і НЛА на специфічність DRB1*16 також припадала четверта частина усіх випадків. Виявлені закономірності дозволяють зробити припущення про те, що особи – власники алелей DRB1*13 (06), DRB1*07 і DRB1*16 складають «групу ризику» щодо розвитку лімфопроліферативних станів у випадку їхнього інфікування ВЕБ.

У V групі хворих домінуючим алелем схильності до виникнення ГТ виявилася специфічність DRB1*07 ($P < 0,001$), відзначена в 6 із 7 обстежених дітей. Звертає на себе увагу алель DRB1*11 (05), що мав місце у 3 дітей. Як було показано вище, дана специфічність відносно часто (35,7 %) виявлялася в осіб із субклінічною формою інфекції ВЕБ (I група). Практичне значення цього факту полягає в тому, що при субклінічній формі або атиповій маніфестації ВЕБ в осіб з алелем DRB1*11 (05) можливе виникнення гострої тромбоцитопенії (ВШ складає 1,4).

На малюнку 2 представлено зіставлення результатів виділення ДНК ВЕБ з лейкоцитів крові з алелями DRB1-локусу для встановлення генетичних маркерів, що визначають спроможність вірусу до внутрішньоклітинного персистування. З 52 обстежених у загальній когорті спостереження у 40 (76,9 %) пацієнтів була виділена ДНК, у 12 (23,1 %) осіб нуклеїнова кислота вірусу не визначалася. Як

видно з діаграми, ДНК ВЕБ переважно виявлялася в осіб з алелем DRB1*13 (06), $P < 0,08$. При цьому значення відносного ризику ВШ=6,6 свідчить про наявність вираженої залежності між носійством даного алеля і персистенцією вірусу. Алель DRB1*04, навпроти, володіє протективним ефектом щодо можливості персистування ДНК ВЕБ у лімфоцитозах периферичної крові (ВШ=0,25, $P < 0,1$). Клінічний аспект виявленого факту має значення для осіб з уродженим чи придбаним імунodefіцитом (ВІЛ, пухлини чи ятрогенна імуносупресія при трансплантації), виступаючи як предикат ризику реактивації інфекції ВЕБ у пацієнта.

Обговорюючи отримані результати, необхідно відзначити особливість ВЕБ-інфекції, яка полягає в схильності до персистування збудника, що призводить до лімфопроліферативних або аутоімунних процесів. Відомо, що з DR-локусом II класу ГКГ тісно зв'язані гени імунореактивності (I_r), що визначають силу імунної реакції на конкретний антиген [8]. При цьому антигени II класу відіграють двояку роль: з одного боку, як презентуючі молекули, а з іншого – як акцептори для проникнення вірусу у середину клітини [9-11]. Можливо, специфічності DRB1*13 (06) і DRB1*16 зв'язані з I_r-генами слабкої імунної відповіді на ВЕБ, що створюють передумови для проникнення, персистенції вірусу і розвитку лімфопроліферативних станів.

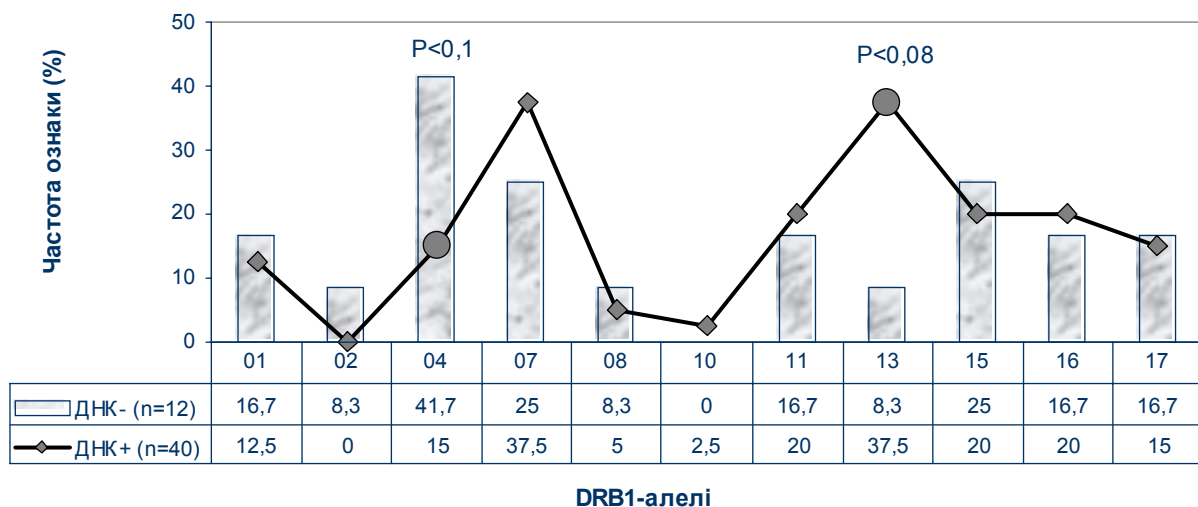
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВЕБ давно розглядається як потенційний етіологічний фактор ГТ [12, 13]. Однак, з огляду на пандемічний характер епідпроцесу (не з точки зору швидкості поширення, а за охопленням населення), виникнення ГТ – досить рідке ускладнення при інфекції ВЕБ. Цей клінічний факт побічно підтверджує необхідність у генетичній схильності для розвитку ГТ. Ймовірна роль ВЕБ полягає в гіперекспресії продуктів алелі DRB1*07 на мембрані тромбоцитів (вірус-індуковані автоантигени), провокуючи тим самим атаку імунної системи на ці антигени. Справа в тому, що молекули, які кодується алелями II класу ГКГ, здійснюють представлення чужорідного антигену на мембрані клітин-мішеней тільки для Т-хелперів (CD3+4+), що є «диригентами імунної відповіді» [14]. Усе це в сукупності призводить до виникнення аутоімунних уражень, і зокрема ГТ.

Разом з тим необхідно визнати, якщо при ІМ етіологічне значення ВЕБ не викликає сумніву, то стосовно НЛА, ЛГМ або ГТ інфікованість цим вірусом може мати, у всякому разі в конкретного пацієнта, характер епіфеномену. Порівняльний аналіз асортименту алелей DRB1-локусу II класу ГКГ дозволив виявити домінування в когорті спостереження порівняно з генеральною сукупністю специфічностей DRB1*13 (06) і DRB1*16 (P<0,012) (мал. 1). Перевага зазначених алелей свідчить про селективну роль ВЕБ-інфекції у реалізації лімфопроліферативного потенціалу в такого контингенту пацієнтів (група ризику стосовно розвитку пухлини!). Водночас зв'язок ВЕБ-інфікування з присутністю алелі DRB1*07 як умови виникнення ГТ залишається відкритим, тому що частота спостереження зазначеного гена вірогідно не відрізнялася між генеральною

популяцією і групами ВЕБ-позитивних пацієнтів ($\chi^2=2,27$, P=0,132). Крім того, необхідно враховувати, що спадкування алелей йде кодомінантно в складі гаплотипу (тобто в сукупності зі специфічностями інших локусів) і нерівнозначним за зчепленням [15]. Іншими словами, алельний склад гаплотипу може як демпфувати «потенційну хворобливість гена», так і навпаки, її експресувати. Тому найбільш цілісним уявленням про роль генетичних факторів у формуванні хвороби, і зокрема ГТ, буде визначення частоти наявності тих чи інших гаплотипів та їхніх значень нерівноваги за зчепленням.

Виявлений зв'язок між генами DRB1-локусу II класу ГКГ і патологією, зумовленою ВЕБ-інфекцією, має і терапевтичний аспект. Уся справа в тому, що захворювання, асоційовані з алелями DRB1-локусу, розглядаються як аутоімунні [16]. Те, що ВЕБ-інфекція провокує розвиток аутоімунних процесів, підтверджують раніше проведені власні дослідження [17]. Так, у сироватці хворих на ІМ методом імуноблотингу були виявлені аутоантитіла, що реагують з поліпептидами з молекулярною масою 23, 70, 120 та 140 кД. Ці білкові структури були тканинно-неспецифічними, тому що спостерігалися в мозку, шлунку і лімфоцитах. Виходячи із зазначеного, слід обережно здійснювати терапію ВЕБ-асоційованих патологій із застосуванням цитокінів, особливо γ -інтерферонів, що підсилюють експресію антигенів (продуктів) генів DRB1-локусу II класу ГКГ на мембранах клітин. Разом з тим, ми анітрохи не агітуємо за бездумне застосування глюкокортикостероїдів у лікуванні ІМ. Однак ці факти пояснюють патогенез уражень і доцільність використання цих препаратів у разі виникнення ускладнень, зокрема ГТ, при ВЕБ-інфекції.



Мал. 2. Зв'язок між поліморфізмом DRB1-локусу і наявністю персистування ВЕБ.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Висновки

1. Типування DRB1-локусу II класу ГКГ людини має важливе практичне значення для прогнозу клінічного перебігу ВЕБ-інфекції.
2. Алель DRB1*04 – ген-протектор, що забезпечує субклінічний перебіг інфекції та пригнічення персистенції ДНК ВЕБ у лейкоцитах периферичної крові.
3. Особи з алеллю DRB1*13 (06) і DRB1*16 є найвразливішими щодо розвитку інфекційного мононуклеозу і лімфопроліферативних захворювань, що асоціюються з ВЕБ-інфекцією.
4. Алель DRB1*13 (06) є предикатом схильності до персистування ДНК ВЕБ у лейкоцитах периферичної крові.
5. Наявність у DR-локусі II класу ГКГ алелі DRB1*07 вказує на високий ризик виникнення тромбоцитопенії в умовах ВЕБ-інфікування.

Література

1. Возіанова Ж.І. Інфекційні і паразитарні хвороби: В 3 т. – К.: Здоров'я, 2001. – Т. 1. – 856 с.
2. Волоха А.П., Чернишова Л.І. Епштейн-Барр вірусна інфекція у дітей // Сучасні інфекції. – 2003. – № 4. – С. 79-93.
3. Інфекційні хвороби у дітей (клінічні лекції) / За ред. С.О. Крамарева. – К.: МОПІОН, 2003. – 480 с.
4. Schooley R.T. Epstein-Barr Virus (Infectious Mononucleosis) // Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases. – 4th ed. – New York: Churchill Livingstone, 1995. – V. 2. – P. 1364-1377.
5. Macsween K. F., Crawford D.H. Epstein-Barr – recent advances // Lancet Infect. Dis. – 2003. – V. 3. – P. 131-140.
6. Hansen T.H., Carreno B.M., Sachs D.H.. The Major Histocompatibility complex // Fundamental immunology / Ed. W. E. Paul. – 3rd ed. – New York: Raven Press, 1993. – P. 577-628.
7. Флетчер З., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. Основы доказательной медицины. – М.: Медиа-Сфера, 1998. – 352 с.
8. Якобисяк М. Імунологія: Пер. з польської за ред. В.В. Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 672 с.
9. Блохина Е.Б. Роль латентной инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр, в развитии лимфопролиферативных заболеваний // Вопр. гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 65-70.
10. Li Q.X., Spriggs M.K., Kovats S. et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes // J. Virol. – 1997. – V. 71. – P. 4657-4662.
11. Rensing M.E., van Leeuwen D., Verreck F.A. et al. Interference with TCR-HLA-DR interactions by EBV gp42 results

in reduced T-helper cell recognition // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2003. – V. 100. – P. 11583-11588.

12. Полин Р.А., Дитмар М.Ф. Секреты педиатрии: Пер. с англ. – М.; СПб: БИНОМ, Невский диалект, 1999. – 784 с.
13. Walter R.B., Hong T.C., Bachli E.B. Life-threatening thrombocytopenia associated with acute Epstein-Barr virus infection in an older adult // Pediatr. Dev. Pathol. – 1999. – V. 2. – P. 72-77.
14. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология. – М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2003. – 604 с.
15. Клиническая иммунология и аллергология: Пер. с англ. / Под ред. Л. Лолора-младшего, Т.Фишера и Д.Адельмана. – М.: Практика, 2000. – 806 с.
16. Филиппов Ю.А., Гайдар Ю.А., Степанова Е.В. и др. Неинвазивная иммуногистохимическая слайд-диагностика аутоиммунных гепатитов // Гастроэнтерология. – Днепропетровськ, 2001. – Вип. 32. – С. 139-142.
17. Пат. 10486 Україна, МПК А6В5/00. Спосіб діагностики аутоімунних станів хворих на інфекційний мононуклеоз, викликаний вірусною інфекцією Епштейна-Барр / Л.Р. Шостакович-Корецька, В.В. Маврутенков, В.В. Недзвецкий, С.В. Кириченко; Дніпропетр. держ. мед. академія; Заявл. 24.12.02; Опубл. 15.07.03. Бюл.№7.

THE R_KLE κF KR-L_KCUS κF HUMAN HIST_KCκMPATIBILITY CκMPLEX IN REVEL_KPMENT κF INFECTI_KUS PR_KCESS AT TYPE IV HERPES-VIRUS INFECTI_KN (EPSTAIN-BARR)

V.V. Mavrutenkov

*SUMMARY. The subject of the study is polymorphism of the genes of DRB1-locus of HLA class II in patients with different clinical manifestations of Epstein-Barr viral infection (EBV). To achieve this goal, genotyping of the nucleotide sequence of the genes of DRB1-locus, as well as the detection of EBV DNA from lymphomonocytes of peripheral blood was performed by means of polymerase chain reaction (PCR) method. The results of the performed study showed that the allele DRB1*04 is a protective gene, which leads to subclinical course of the infection and inhibits the persistence of EBV DNA in lymphomonocytes of peripheral blood. The patients with the alleles DRB1*13 (06) and DRB1*16 (02) are the most susceptible to the development of infectious mononucleosis and lymphoproliferative disorder associated with EBV-infection. The allele DRB1*13 (06) predicates the predisposition for EBV DNA persistence in lymphomonocytes of peripheral blood. The availability of class II HLA allele DRB1*07 in DR-locus points out the high risk of thrombocytopenia development in conditions of EBV-infection.*