

ОСОБЕННОСТИ СОМАТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ГЕНОВ ТЯЖЁЛЫХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ И ХРОНИЧЕСКОМ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ С

¹ *Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск,*

² *Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь*

Процесс соматической рекомбинации предшествует соматическим гипермутациям и инициирует активацию фермента цитидиндезаминазы. Реаранжировки генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов исследуются с применением полимеразной цепной реакции [1, 2]. Данный метод нашёл широкое применение для диагностики лимфопролиферативных заболеваний. Накоплено большое количество экспериментальных данных по описанию ПЦР-картины для моноклональных популяций В-лимфоцитов, характерных для лейкозов и лимфом. В 1999-2005 гг. исследование процессов соматической рекомбинации генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора (TCRD, TCRG) при острых лимфобластных лейкозах проведено в Республике Беларусь и у пациентов с острым лимфобластным лейкозом [3].

Топография реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов проводилось с праймерами набора ISH Somatic Hypermutation Assay (In Vivoscribe Technologies, USA) после тестирования качества ДНК праймерами Specimen Control Size Ladder. Образуемые ампликоны отражают весь вариабельный домен с FR1 и до окончания J-региона, FR2-JH и FR3-JH фрагменты. Экстракция ДНК проводилась из клеточного материала набором «Нуклеосорб-В» (РФ). Спектр образуемых ПЦР-продуктов исследовался с помощью агарозного гель-электрофореза. Электрофореграммы фотографировались цифровой фотокамерой с разрешением 14 мегапикселей, сохранялись в формате .jpg и анализировались с ис-

пользованием пакета программ GelAnalyzer. Для исследования частоты встречаемости признака использованы критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса (уровень статистической значимости $p < 0,01$) и точный критерий Фишера (уровень статистической значимости $p < 0,05$).

Все исследованные образцы ($n=46$), как полученных от пациентов с хроническим вирусным гепатитом С (ХВГС), инфекционным мононуклеозом, так и от здоровых добровольцев имели поликлональную картину генных реаранжировок. Из всех 46 изученных образцов 5 (причём, 3 из них относились к группе здоровых добровольцев) отличались выраженными признаками клональности. Все полосы содержали крупные фрагменты результатов соматической рекомбинации (свыше 390 нп). Более половины образцов, полученных от здоровых лиц (15 из 22 оцифрованных) имели фрагмент, соответствующий переключению аллели.

Одной из задач исследования ставилось описание паттернов поликлональной соматической рекомбинации для выявления иммунологического полиморфизма и индивидуальной вариативности, гетерогенности популяции по данному признаку. Наиболее постоянный, устойчивый характер носили продукты небольшого размера в диапазоне от 80 до 120 пар оснований. Были отмечены образцы, без яркой полосы в диапазоне 350-400 пар оснований, а большинство реаранжировочных продуктов отмечалось в интервале 80-250 пар оснований с наиболее интенсивными пиками в районе 100 и 250 нуклеотидных пар [2, 5]. Таким образом, исследование соматической рекомбинации в популяциях В-лимфоцитов здоровых добровольцев выявило вариантный характер генных реаранжировок: первая форма отличалась преобладанием FR1-JH-фрагментов; вторая, наоборот, не характеризовалась преобладанием полных продуктов V(D)J-реаранжировок (рис.). Для большинства поликлональных образцов фрагменты порядка 250 пар оснований, соответствующие FR2-JH-фрагменту, совпадали по размеру с полным FR1-JH фрагментом [5].

Во всех исследованных образцах было выявлено присутствие высокомолекулярных фрагментов, соответствующих неэффективным формам соматической рекомбинации или переключению аллели. Ряд образцов имел выраженные фрагменты, кратные по длине главному реаранжировочному продукту, размерами около 750 и 1500 нп. Полоса, размером около 1500 пар оснований может соответствовать переключению аллели в процессе соматической рекомбинации (табл.).

Характеристика соматической рекомбинации пациентов с инфекционным мононуклеозом, ХВГС-инфекцией и здоровых лиц

Исследованные группы	n образцов	Тип рекомбинации		Фрагмент 1500 нп	
		1-й	2-й тип	Есть	Нет
Здоровые лица	22	17	5	15	7
ИМ	10	2	8*	5	5
ХВГС-инфекция	10	3	7**	1***	9

* – встречается достоверно чаще, чем у здоровых лиц; ** – встречается достоверно чаще, чем у здоровых лиц; *** – встречается достоверно реже, чем у здоровых лиц.

При выделении форм соматической рекомбинации фореграммы оцифровывались в программе GelAnalyzer [5]. В полученных значениях абсолютной ярко-

сти выделялись пики, далее они сопоставлялись между собой. Критерием отношения к первой группе соматической рекомбинации было преобладание яркости FR1-JH к FR2-JH более, чем в 1,5 раза. Большинство из оцифрованных образцов от здоровых лиц (77,3 %) относились к первому типу. Для пациентов с ХВГС и инфекционным мононуклеозом второй тип рекомбинации отмечался чаще, чем у здоровых лиц: 8 из 10 образцов (80 %) с ИМ относились ко второму типу рекомбинации (критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 7,13 ($p < 0,01$), точный критерий Фишера (двусторонний) 0,0056); 7 из 10 образцов с ХВГС также имели схожую ПЦР-картину (критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 4,69 ($p < 0,05$), точный критерий Фишера (двусторонний) 0,0018). Длинный фрагмент длиной 1500 нп был выявлен только в 2-х образцах (20 %) с ХВГС (достоверно реже, чем у здоровых лиц: критерий Хи-квадрат с поправкой Йейтса 7,13 ($p < 0,01$), точный критерий Фишера (двусторонний) 0,0039) (рис.).

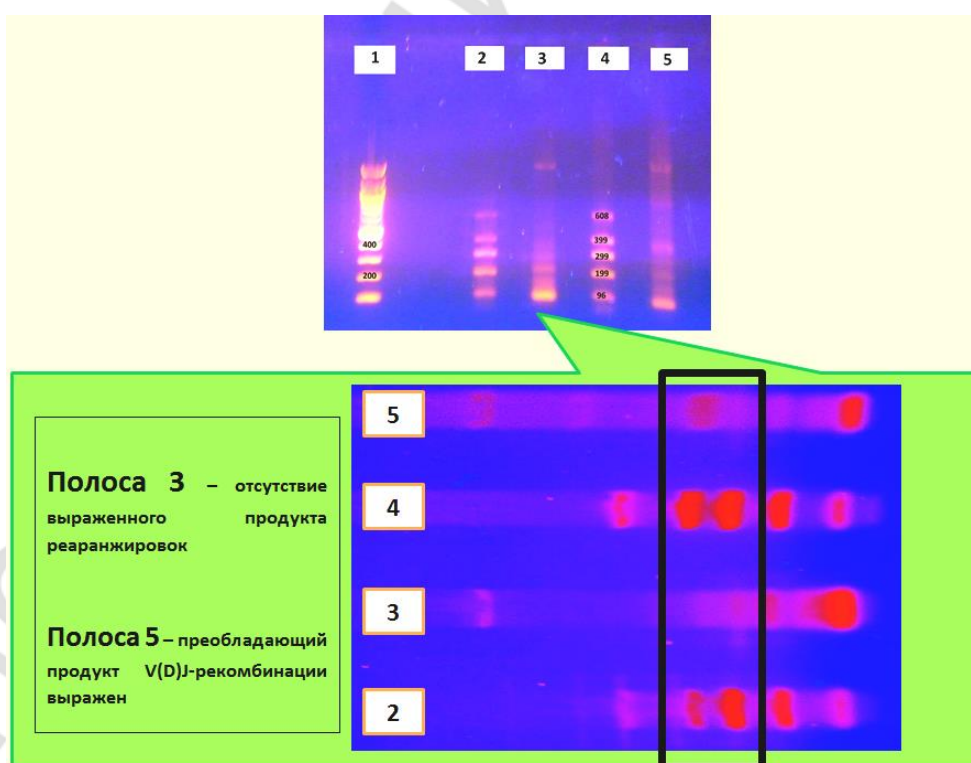


Рис. Различие картин соматической рекомбинации в поликлональных популяциях В-лимфоцитов

Напротив, при инфекционном мононуклеозе распределение было 5 к 5. У здоровых добровольцев большой фрагмент, трактуемый, как переключение аллели, наоборот, встречался чаще: 15 образцов из 22 оцифрованных (68,2 %), что можно соотносить с нормой. Учитывая эти 2 фактора (таблица), можно сделать вывод о характерных чертах поликлональной картины соматической рекомбинации при ХВГС-инфекции: топография соматической рекомбинации пациентов с ХВГС-инфекцией сопровождается более частой, чем в норме, второй формой соматической рекомбинации. И значимо более редким наличием кратных полному продукту рекомбинации элементов (переключением аллели).

Выводы. Исследование соматической рекомбинации в популяциях В-лимфоцитов здоровых добровольцев характеризуется 2 формами генных реаранжировок: первая форма отличалась преобладанием FR1-ЈН-фрагментов; вторая, наоборот, не характеризовалась преобладанием полных продуктов V(D)J-реаранжировок. Топография клонального статуса характеризуется высоким содержанием высокомолекулярных продуктов рекомбинации, в том числе – кратных FR1-ЈН фрагменту, соответствующих неэффективным формам соматической рекомбинации или переключению аллели. Топография соматической рекомбинации пациентов с ХВГС-инфекцией сопровождается более частой, чем в норме, второй формой соматической рекомбинации. И значимо более редким наличием кратных полному продукту рекомбинации элементов (переключением аллели).

ЛИТЕРАТУРА

1. Miller, J. E. An automated semiquantitative B and T cell clonality assay / J. E. Miller // Mol. Diagn. 1999. Vol. 4. P. 101-117.
2. Van Dongen, J. J. M. Immunobiology of Leukemia / J. J. M. Van Dongen, H. J. Adriaansen // Leukemia. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996. P. 83–130.
3. Meleshko, A. N. Detection of rearranged immunoglobulin and T-cell receptor genes as a method for characterization of tumor cell clonality in acute lymphoblast leukemia in children / A. N. Meleshko, M. P. Potapnev // Klin. Lab. Diagn. 2004. № 4. P. 19–22
4. Optimal primer selection for clonality assessment by polymerase chain reaction analysis: I. Low grade B-cell lymphoproliferative disorders of nonfollicular center cell type / G. H. Segal [et al.] // Hum. Pathol. 1994. Vol. 25. P. 1269-1275.
5. Павлов, К. И. Диагностическая значимость исследования реаранжировок генов тяжёлых цепей иммуноглобулинов / К. И. Павлов // Лечебное дело. 2015. № 1. С. 46-51.