

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт
гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства»**

ВЕСТНИК ГЕМАТОЛОГИИ

THE BULLETIN OF HEMATOLOGY

Том XIV № 2 2018

Ежеквартальный научно-практический журнал
Основан в сентябре 2004 года

Главный редактор

Доктор медицинских наук
профессор
С. С. Бессмельцев

Санкт-Петербург
2018

Редакционная коллегия:

С. С. Бессмельцев (главный редактор)

А. Н. Богданов; Л. Н. Бубнова; Т. В. Глазанова (ответственный секретарь);

С. А. Гусева; А. Ю. Зарицкий; Н. М. Калинина; Л. П. Папаян; В. Г. Радченко;

В. И. Ругаль; О. А. Рукавицын; В. Н. Чеботкевич, С. В. Грицаев.

Редакционный совет:

Б. В. Афанасьев (Санкт-Петербург); *В. В. Базарный* (Екатеринбург);

М. Л. Гершанович (Санкт-Петербург); *К. Г. Дуткевич* (Санкт-Петербург); *Г. А. Зайцева* (Киров);

Ю. М. Захаров (Челябинск); *Л. Г. Ковалева* (Москва); *А. В. Литвинов* (Смоленск);

В. И. Мазуров (Санкт-Петербург); *И. В. Поддубная* (Москва); *Т. Н. Поспелова* (Новосибирск);

А. Г. Румянцев (Москва); *В. Г. Савченко* (Москва); *Н. Н. Третьяк* (Киев); *Н. П. Шабалов* (Санкт-Петербург).

Зав. редакцией — *Е. Р. Шилова*, тел.: (812) 717-58-57

Ответственный секретарь — *Т. В. Глазанова*, тел.: (812) 717-08-90, факс: (812) 717-20-87

Адрес редакции:

191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16

E-mail: bloodscience@mail.ru

Сайт: www.bloodscience.ru

За содержание рекламных объявлений редакция ответственности не несет.

При перепечатке материалов ссылка на журнал «Вестник гематологии» обязательна.

Мнение членов редакционной коллегии не всегда совпадает с мнением авторов статей.

Обложка и художественное оформление *О. С. Дмитриева*

Компьютерная верстка *О. С. Дмитриева*

Журнал зарегистрирован Северо-Западным окружным межрегиональным территориальным управлением по Санкт-Петербургу и Ленинградской области Министерства Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средствам массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации ПИ № 2-7271 от 28 мая 2004 г.

Подписано в печать 20.04.2018 г. Формат бумаги 60 × 90 1/8.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 500 экз. Заказ 177.

Издательство РосНИИГТ, 193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 16.

Отпечатано в ООО «Агентство «ВиТ-принт»», Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23.

18 +

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ:

Ищенко И. В., Кудинова Э. Е., Савченко О. А., Труфанова Т. И., Шатохин Ю. В., Рябикина Е. В., Снежко И. В., Алавердян А. И.
ГЕНЫ HLA II КЛАССА DRB1 И DQB1 У ДОНОРОВ РЕГИСТРА
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ 4

Пархоменко Т. В., Клыценко О. А., Томсон В. В., Галибин О. В.
ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭРИРОПОЭТИНА
НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ Т-ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА КРЫС *in vitro* 12

В ПОМОЩЬ ПРАКТИЧЕСКОМУ ВРАЧУ

**Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием
«АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОГЕНЕТИКИ И ТКАНЕВОГО ТИПИРОВАНИЯ»
Санкт-Петербург, 30–31 мая 2018 г. 19**

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

Ishenkova I. V., Kudinova E. E., Savchenko O. A., Trufanova T. I., Shatokhin Y. V., Ryabikina E. V., Snezhko I. V., Alaverdyan A. I.
HLA II CLASS DRB1 AND DQB1 GENES OF DONORS OF THE REGISTER
OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF THE ROSTOV-ON-DON 4

Parkhomenko T. V., Klytsenko O. A., Tomson V. V., Galibin O. V.
A STUDY ON THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON THE MEMBRANE POTENTIAL
OF T-LYMPHOCYTES THYMUS OF RATS *in vitro* 12

**Ищенкова И. В.¹, Кудинова Э. Е.¹, Савченко О. А.¹, Труфанова Т. И.¹,
Шатохин Ю. В.², Рябикина Е. В.², Снежко И. В.², Алавердян А. И.²**

¹ Государственное бюджетное учреждение Ростовской области «Станция переливания крови»

² Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**ГЕНЫ HLA II КЛАССА DRB1 И DQB1 У ДОНОРОВ РЕГИСТРА
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ**

**Ishenkova I. V.¹, Kudinova E. E.¹, Savchenko O. A.¹, Trufanova T. I.¹,
Shatokhin Y. V.², Ryabikina E. V.², Snezhko I. V.², Alaverdyan A. I.**

¹ State budgetary institution of the Rostov region «Blood transfusion station»

² Federal State Budgetary Education Institution of Higher professional education «Rostov state medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,

**HLA II CLASS DRB1 AND DQB1 GENES OF DONORS OF THE REGISTER
OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS OF THE ROSTOV-ON-DON**

Резюме. Представлены результаты типирования генов HLA II класса DRB1, DQB1 у 694 доноров ГСК г. Ростова-на-Дону, считающих себя русскими. Рассмотрено распределение частоты аллельных семейств, двухлокусных гаплотипов, неравновесного сцепления DRB1, DQB1-генов. В ростовской популяции с высокой частотой встречались аллельные семейства гена HLA DRB1*11; HLA DRB1* 15; HLA DRB1*07; HLA DRB1*13; HLA DRB1*03; HLA DRB1*01; с низкой частотой встречались аллельные семейства DRB1*09, DRB1*12. В локусе DQB1 наиболее часто встречались HLA DQB1*02, DQB1*03, DQB1*06. Представлены результаты сравнения частоты аллельных семейств ростовской популяции с русскими популяциями России, и с популяциями других народов.

Данный тип распределения генных частот позволяет отнести ростовскую популяцию к европеоидам. Отмечены особенности частоты аллельных семейств DRB1*01, DRB1*11 в ростовской популяции по сравнению с русскими жителями Европейских регионов России.

Ключевые слова. Гены HLA II класса, гаплотипы, популяция, доноры ГСК.

Abstract. The results of typing of genes HLA II class DRB1, DQB1 of 694 donors of the HSC of Rostov-on-Don, who consider themselves to be Russian, are presented. The frequency distribution of allelic families, bipolar haplotypes, nonequilibrium cohesion of DRB1, DQB1-genes is considered. In Rostov population with a high frequency met allelic gene family DRB1×11; HLA DRB1×15; HLA DRB1×07; HLA DRB1×13; HLA DRB1×03; HLA DRB1×01. With a low frequency there were allelic families DRB1×09, DRB1×12. At the locus DQB1 the most frequently encountered HLA DQB1×02, DQB1×03, DQB1×06. The results of comparison of the frequency of allelic families of the Rostov population with Russian populations of Russia, and with populations of other nations are presented.

This type of distribution of gene frequencies allows us to refer the Rostov population to Caucasoids. The peculiarities of the frequency of the allelic families DRB1×01, DRB1×11 in the Rostov population are compared with the Russian inhabitants of the European regions of Russia.

Key words. HLA class II genes, haplotypes, population, HSC donors.

Введение. На данный момент система HLA (Human Leukocyte Antigens) является самой изученной и самой полиморфной системой генома человека. Гены системы HLA представлены двумя основными классами: класс HLA I (гены HLA-A, — B, — C) и класс HLA II (гены HLA-DRB1, DQA1, DQB1). Гены, соответственно, кодируют молекулы класса I, которые экспрессируются на поверхности всех ядродержащих клеток, а молекулы класса II находятся на макрофагах, активированных Т-лимфоцитах и В-лимфоцитах.

С момента появления молекулярно-генетических методов типирования появилась возможность получать о системе HLA информацию более высокого уровня, особенно для генов HLA II класса. Была доказана неоспоримая роль генов HLA II класса в иммунном ответе и определена их причастность к ассоциативной предрасположенности или устойчивости к некоторым видам патологии (например, сахарный диабет I типа).

Необычайный полиморфизм генов системы HLA определяется не только большим количеством аллельных семейств, но и существованием множественных аллелей (альтернативных вариантов) в каждом семействе.

Кроме того, специфичности HLA, являясь генами иммунного ответа, по-разному представлены в расах и имеют разную частоту, характерную для определенной этнической группы. То есть, популяционный полиморфизм носит выраженный межрасовый и межэтнический характер.

Согласно проведенным исследованиям, частота аллельных семейств и вариантов аллелей генов HLA в разных популяциях, даже одного этноса, имеет различия. Поэтому изучение HLA-профиля здорового населения популяций в пределах одной страны, в ее регионах и в разных странах мира является важным для практической медицины, и прежде всего, для целенаправленного поиска донора для неродственной аллогенной трансплантации костного мозга, для выявления маркеров предрасположенности или резистентности к различным заболеваниям, что в свою очередь может оказать помощь в диагностике.

Знание HLA-профиля позволяет определять генетические расстояния между любыми популяциями мира, а это важная информация для этнологии.

Удобной контрольной группой для анализа HLA-профиля популяции могут быть доноры

крови, давшие согласие быть донорами ГСК, с учетом их этнической принадлежности. Эта контрольная группа представляет собой здоровую часть исследуемой популяции, типирована по генам системы HLA I и II класса и полностью отражает ее структуру и иммуногенетические характеристики [1,2,3,14].

Россия — пока еще не полностью исследованный по распределению генов HLA регион мира, но к настоящему времени изучено популяционное разнообразие русских и других народов, проживающих в различных регионах России и ближнего зарубежья. В Ростовской области, расположенной на юге европейской части России, исследование генов HLA II класса не проводилось.

Первую половину XVI века считают временем возникновения донского казачества. С этого момента, после Золотой Орды, началось заселение низовьев Дона и Приазовья, которые находились за пределами основной государственной территории, за линией сторожевых укреплений. Заселяли новые земли в основном великорусские беглые крестьяне, которые стремились уйти от усиливающегося гнета и обрести экономическую и социальную свободу. В конце XVI и в XVII веке число беглых на Дон увеличилось. В основном бежали из Воронежской, Тамбовской, Рязанской и других губерний, кроме того переселялись татары, поляки, литовцы, запорожские казаки, калмыки. Донское казачество формировалось с XVI в. в основном из русских и украинцев. В конце XVIII в. произошло массовое переселение на Дон армян и греков [9,10].

Согласно Всероссийской переписи населения 2010 г. в г. Ростове-на-Дону проживают: русские 89,35 %, армяне — 3,4 %, украинцы — 1,5 %, азербайджанцы — 0,6 %, татары — 0,5 %, грузины — 0,4 %, белорусы — 0,3 %, евреи — 0,2 %. Кроме того, большие этнические группы представляют греки, чеченцы, турки, корейцы, молдаване, цыгане, удмурты и другие. 2005 человек из русских жителей г. Ростова относят себя к коренному населению — казакам.

Цель исследования. Установить распределение генов HLA II класса DRB1* и DQB1* у доноров ГСК г. Ростова-на-Дону, проживающих в Южном федеральном округе и считающих себя русскими в 3 поколении. Провести сравнительный анализ с аналогичными исследованиями в популяциях русских и других народов, проживающих в различных регионах России и за рубежом.

Материалы и методы. Исследование проводили в Государственном бюджетном учреждении Ростовской области «Станция переливания крови» в Зональной лаборатории иммунологического типирования тканей.

На оборудовании и расходных материалах, предоставленных нам благотворительным фондом «Русфонд», в 2015 – 2017 гг. было проведено ДНК-типирование 694 доноров крови, давших согласие быть донорами ГСК. Это — случайные, здоровые люди, считающие себя русскими, в возрасте от 18 до 42 лет. Из них — 358 — мужчины и 336 — женщины.

Геномную ДНК выделяли из венозной крови доноров (колоночным методом) реагентами «Protrans» (DNA Box 500). Молекулярно-генетическое типирование (базовое разрешение) проводили полимеразной цепной реакцией набором сиквенс-специфических праймеров (PCR-SSP). Детекцию проводили в 2 % агарозном геле с использованием электрофореза. Все исследования выполняли стандартными реактивами фирмы «Protrans» (Германия) по протоколу производителя.

Расчет основных иммуногенетических показателей: частоты (gf) 13 специфичностей гена HLA DRB1* и 5 специфичностей гена HLA DQB1*, частоты (HF) двухлокусных гаплотипов HLA DRB1* — HLA DQB1*, величины не-

равновесного сцепления (D^1) был проведен с использованием компьютерной программы Арлекин, версия 3.5.

Неравновесное сцепление (D) или неслучайная ассоциация между аллелями разных локусов — величина, показывающая, реже или чаще встречается комбинация генов на хромосоме [3].

Достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали с помощью критерия χ^2 (имелась возможность сравнить наши результаты с популяцией русских Челябинской области [7] и популяцией удмуртов северо-востока России [18]).

Полученные нами результаты сравнивали с данными литературы, анализируя следующие популяции: русские — жители Архангельской, Вологодской, Костромской, Смоленской и Челябинской областей; Астрахани, Москвы, Санкт-Петербурга [4,8,12,15]; белорусы [5]; украинцы [5]; армяне [5]; гагаузы [5]; курды [17]; татары [5,7,13]; калмыки [5]; казахи [6,14]; башкиры [7,11,16]; буряты [6]; саамы [6]; удмурты [5,16,18].

Результаты и обсуждение. Результаты ДНК-типирования генов HLA II класса DRB1 и DQB1 у доноров регистра ГСК г. Ростова-на-Дону, считающих себя русскими, представлены в *таблице 1*.

Таблица 1

Частота генов HLA DRB1* и HLA DQB1* у русских г. Ростова-на-Дону

Аллельное семейство ^a	Кол-во ^b	Частота аллеля (pf)	Частота гена (gf)	SE для (gf) ^c	Гом ^d
DRB1*01	136	0,196	0,106	0,008	11
DRB1*03	105	0,151	0,081	0,007	7
DRB1*04	139	0,200	0,103	0,008	4
DRB1*07	170	0,245	0,132	0,009	13
DRB1*08	38	0,055	0,027	0,004	0
DRB1*09	13	0,019	0,009	0,003	0
DRB1*10	13	0,019	0,009	0,003	0
DRB1*11	198	0,285	0,159	0,01	22
DRB1*12	24	0,035	0,017	0,004	0
DRB1*13	169	0,244	0,131	0,009	13
DRB1*14	23	0,033	0,017	0,003	0
DRB1*15	182	0,262	0,142	0,009	15
DRB1*16	89	0,128	0,067	0,007	4
DQB1*02	225	0,324	0,178	0,010	22
DQB1*03	393	0,566	0,354	0,013	98
DQB1*04	37	0,053	0,027	0,004	1
DQB1*05	250	0,360	0,203	0,011	32
DQB1*06	283	0,408	0,238	0,011	47

^b — Количество положительных индивидуумов.

^c — Стандартная ошибка (SE) для частоты гена (gf).

^d — Количество обнаруженных гомозиготных индивидуумов.

С высокой частотой в ростовской популяции встречались аллельные семейства гена HLA DRB1*11(0,159), DRB1*15(0,142), DRB1*07(0,132), DRB1*13(0,131), DRB1*01(0,106), DRB1*04(0,103).

С одинаковой частотой и редко встречались аллельные семейства HLA DRB1*09 и DRB1*10 (0,009), DRB1*12 и DRB1*14(0,017); также снижена частота HLA DRB1*08 (0,027).

Частота специфичностей гена HLA DRB1* у русских г. Ростова оказалась сопоставимой с его частотой в 8 популяциях русских (горожан и жителей областей) из разных регионов России (таблица 2). Однако, в ростовской популяции имеются особенности в частоте распределения некоторых аллельных семейств гена DRB1*.

Таблица 2

Частота гена HLA DRB1 у русских г. Ростова-на-Дону и в популяциях русских различных регионов России

Аллельные семейства	Частота гена DRB1*								
	г. Ростов (n-694)	г. Астрахань (n-81)	г. Москва (n-300)	г. Санкт-Петербург (n-200)	Челябинская область (n-591)	Архангельская область (n-82)	Вологодская область (n-121)	Костромская область (n-126)	Смоленская область (n-156)
DRB1*01	0,106	0,079	0,095	0,122	0,128	0,130	0,124	0,174	0,064
DRB1*03	0,081	0,061	0,075	0,095	0,099	0,093	0,074	0,123	0,093
DRB1*04	0,103	0,091	0,115	0,142	0,106	0,166	0,141	0,119	0,103
DRB1*07	0,132	0,165	0,143	0,120	0,135	0,123	0,149	0,142	0,173
DRB1*08	0,027	0,024	0,018	0,038	0,023	0,037	0,054	0,040	0,032
DRB1*09	0,009	0,030	0,007	0,012	0,016	0,031	0,025	0,008	0,006
DRB1*10	0,009	0,019	0,013	0,010	0,011	0,012	0,004	0,012	0,006
DRB1*11	0,159	0,146	0,142	0,110	0,119	0,056	0,095	0,060	0,173
DRB1*12	0,017	0,006	0,028	0,028	0,025	0,025	0,012	0,020	0,023
DRB1*13	0,131	0,201	0,142	0,125	0,145	0,099	0,149	0,120	0,106
DRB1*14	0,017	0,000	0,023	0,024	0,014	0,012	0,012	0,016	0,032
DRB1*15	0,142	0,159	0,132	0,132	0,140	0,197	0,144	0,138	0,154
DRB1*16	0,067	0,019	0,067	0,043	0,040	0,019	0,017	0,028	0,035

Так, частота DRB1*11 в г. Ростове (0,159) оказалась значительно выше, чем в других популяциях русских. Например, по сравнению с жителями Челябинской области она достоверно выше (0,119; $\chi^2 - 36,5$; $p < 0,01$). И только в Смоленской области частота DRB1*11 (0,173) выше, чем в г. Ростове. Мы предполагаем, что высокая частота DRB1*11 у русских жителей Ростовской области может быть обусловлена влиянием средиземноморских популяций, у которых частота DRB1*11 максимальна [5, 17].

Аллельное семейство DRB1*01 в ростовской популяции (0,106) имеет тенденцию к снижению по сравнению с другими популяциями русских. Его частота достоверно ниже, чем в Челябинской области (0,128; $\chi^2 - 9,2$; $p < 0,05$), однако, она выше, чем в г. Астрахани (0,079) и Смоленской области (0,064). DRB1*01 наиболее характерен для популяций финноугорской языковой семьи (саамов,

удмуртов), а также для популяций волго-уральского региона [5, 16, 18].

DRB1*07 встречается с частотой 0,132 так же как у восточно-славянских народов (русские, украинцы, белорусы), но ниже, чем у тюркских народов России (удмуртов, башкир [5, 6, 16, 18]).

Частота DRB1*16 в популяции г. Ростова одинакова с таковой в г. Москве (0,067), но несколько выше, чем в остальных сравниваемых популяциях, и достоверно выше, чем в челябинской популяции русских (0,040; $\chi^2 - 37,6$, $p < 0,01$).

Кроме того, отмечается повышение частоты DRB1*15 в Архангельской, Смоленской областях и г. Астрахани (0,197; 0,154; 0,159, соответственно); по сравнению с г. Ростовом (0,142).

Высокая частота специфичностей HLA-DRB1*01, DRB1*03, DRB1*07, DRB1*11, DRB1*13, DRB1*15, и низкая — HLA-DRB1*09,

DRB1*12 у русских жителей г. Ростова — типичный западноевропейский вариант частоты гена HLA DRB1* европеоидной расы, что позволяет отнести ростовскую популяцию к европеоидам.

Основным этносом Ростовской области являются русские, однако, ее относят к полиэтническому региону, учитывая ее историю заселения и географическое положение. Поэтому мы провели сравнение частоты генов HLA

II класса русских г. Ростова с HLA-профилями популяций этнических групп, проживающих в административном центре области, согласно последней переписи населения. В литературных источниках мы нашли результаты популяционных исследований по ряду групп, важных для сравнения. Прежде всего — это жители Восточной Европы — украинцы и белорусы (таблица 3).

Таблица 3

Частота гена HLA DRB1 у русских г. Ростова и в популяциях украинцев и белорусов

Аллельные семейства	Частота гена HLA DRB1*					
	г. Ростов (n-694)	УКРАИНЦЫ		БЕЛОРУСЫ		
		Львовская область (n-102)	Хмельницкая область (n-70)	Витебская область (с) (n-70)	Брестская область (ю-з) (n-105)	Гомельская область (ю-с) (n-100)
DRB1*01	0,106	0,123	0,098	0,100	0,105	0,129
DRB1*03	0,081	0,078	0,054	0,070	0,090	0,107
DRB1*04	0,103	0,113	0,112	0,075	0,128	0,100
DRB1*07	0,132	0,152	0,145	0,105	0,105	0,107
DRB1*08	0,027	0,039	0,036	0,055	0,029	0,036
DRB1*09	0,009	0,015	0,004	0	0,019	0
DRB1*10	0,009	0	0,011	0	0,005	0,007
DRB1*11	0,159	0,185	0,185	0,150	0,133	0,157
DRB1*12	0,017	0,010	0,022	0,040	0,038	0,007
DRB1*13	0,131	0,108	0,123	0,165	0,119	0,100
DRB1*14	0,017	0,020	0,022	0,010	0,029	0,050
DRB1*15	0,142	0,098	0,101	0,185	0,133	0,121
DRB1*16	0,067	0,059	0,087	0,045	0,067	0,079

Сравнительный анализ показал, что частота HLA DRB1* гена в г. Ростове сопоставима с его частотой в популяциях украинцев и белорусов. Однако аллельное семейство DRB1*11 в ростовской популяции (gf – 0,159) встречается реже по сравнению с двумя популяциями украинцев (gf – 0,185). Чаще, по сравнению с украинцами, встречается

DRB1*15(0,142 и 0,098, 0,101, соответственно).

Полученные нами данные по частоте гена DRB1*, мы сравнили с его распределением в популяциях армян, гагаузов (самоопределившиеся жители Молдовы), курдов, татар, удмуртов и калмыков (таблица 4).

Таблица 4

Частота гена HLA DRB1* у русских и в этнических группах, проживающих в г. Ростове-на-Дону

Аллельные семейства	Частота гена HLA DRB1*						
	г. Ростов (n-694)	Армяне (n-83)	Гагаузы (n-225)	Курды (n-209)	Татары (n-87)	Удмурты (n-101)	Калмыки (n-136)
DRB1*01	0,106	0,066	0,122	0,043	0,069	0,124	0,051
DRB1*03	0,081	0,066	0,123	0,150	0,086	0,054	0,125
DRB1*04	0,103	0,204	0,073	0,126	0,074	0,045	0,136
DRB1*07	0,132	0,090	0,082	0,078	0,241	0,322	0,103
DRB1*08	0,027	0	0,016	0,016	0,012	0,035	0,051
DRB1*09	0,009	0	0,011	0,012	0,006	0,040	0,051
DRB1*10	0,009	0,042	0,016	0,019	0,029	0	0,023
DRB1*11	0,159	0,229	0,240	0,260	0,052	0,099	0,077
DRB1*12	0,017	0,025	0,007	—	0,012	0,025	0,092

Аллельные семейства	Частота гена HLA DRB1*						
	г. Ростов (n-694)	Армяне (n-83)	Гагаузы (n-225)	Курды (n-209)	Татары (n-87)	Удмурты (n-101)	Калмыки (n-136)
DRB1*13	0,131	0,055	0,071	0,096	0,190	0,090	0,136
DRB1*14	0,017	0,054	0,060	0,064	0,028	0,010	0,055
DRB1*15	0,142	0,103	0,053	0,110	0,155	0,159	0,092
DRB1*16	0,067	0,036	0,126	0,026	0,046	0	0,008

Оказалось, что частота DRB1*11 в популяциях армян (0,229), гагаузов (0,240), курдов (0,260) была значительно выше по сравнению с русскими жителями г. Ростова (0,159), а у татар, удмуртов и калмыков (0,052, 0,099, 0,077) она была значительно снижена. Частота аллельного семейства DRB1*01 у армян и калмыков (0,066; 0,051 соответственно)

оказалась ниже, чем в ростовской популяции (0,106).

Распределение частоты гена HLA DQB1* у русских г. Ростова, г. Санкт-Петербурга, Челябинской области и в популяциях народов, этнические группы которых длительно проживают на Дону, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Частота гена HLA DQB1* у русских г. Ростова и в популяциях других этносов

Аллельное семейство	Частота гена DQB1						
	Ростов-на-Дону (n=694)	Санкт-Петербург (n=200)	Челябинская область (n=591)	Удмурты (n=101)	Курды Ирана (n=110)	Казахи (n=157)	Саамы (n=107)
DQB1*02	0,178	0,175	0,201	0,326	0,222	0,238	0,111
DQB1*03	0,354	0,36	0,334	0,278	0,425	0,394	0,513
DQB1*04	0,027	0,04	0,022	0,015	0,009	0,032	0,049
DQB1*05	0,203	0,22	0,196	0,133	0,174	0,191	0,179
DQB1*06	0,238	0,205	0,247	0,248	0,167	0,144	0,155

Результаты типирования показывают, что в ростовской популяции чаще встречаются аллельные семейства гена DQB1*03 (gf – 0,354) и значительно реже DQB1*04 (gf – 0,027).

Анализ сравнения частоты гена DQB1* русских г. Ростова с русскими г. Санкт-Петербурга и Челябинской области показал, что частота гена сопоставима во всех трех популяциях (особенно близка к популяции г. Санкт-Петербурга): чаще встречаются специфичности DQB1*03, реже — DQB1*04. Частота DQB1*02 оказалась почти одинаковой в городах Ростове (0,178) и Санкт-Петербурге (0,175), но была достоверно снижена по сравнению с русскими Челябинской области (0,201; $\chi^2 - 10,76$; $p < 0,05$) и была выше, чем у саамов (0,111).

В заключение можно отметить, что иммуногенетическая структура популяции г. Ростова, состоящая из доноров регистра ГСК,

считающих себя русскими, характеризует ее как европеоидную популяцию. Это предположение подтверждается совпадением ее характеристик с популяциями русских, проживающих в Европейских регионах России, а также белорусов и украинцев.

Некоторые особенности в распределении частоты гена DRB1* могут быть объяснены историей заселения Дона, постоянной близостью проживания и контактами с другими большими этническими группами г. Ростова. Можно предположить, что повышенная частота DRB1*11 в ростовской популяции (0,159), по сравнению с русскими, проживающими в других регионах России, оказалась таковой из-за возможного влияния популяций украинцев, армян, гагаузов, курдов, имеющих повышенную частоту этой специфичности (0,185; 0,229; 0,240; 0,260 — соответственно).

В ростовской популяции отмечено некоторое снижение частоты DRB1*01 (0,106)

по сравнению с другими популяциями русских (0,122 – 0,174). Возможно, это — следствие сниженного контакта с финскими этническими группами и влияния этносов с низкой частотой данной специфичности, длительно проживающих на Дону — армян (0,066) и калмыков (0,051).

В таблице 6 представлены данные по частоте гаплотипов (HF) и величине неравновесного сцепления (D') двухлокусных гаплотипов DRB1* – DQB1* (встречающихся с частотой 0,009 и выше у русских г. Ростова) и, для сравнения, у русских Челябинской области.

Таблица 6

Частота гаплотипов HLA DRB1* - HLA DQB1* в популяциях русских г. Ростова-на-Дону и Челябинской области

Гаплотип	г. Ростов-на-Дону				Челябинская область		
	+/+	Частота	Частота, %	D'	+/+	Частота, %	D'
DRB1*01 DQB1*05	145	0,104	10,4	1	149	12,61	0,98
DRB1*03 DQB1*02	107	0,077	7,7	0,95	114	9,64	0,97
DRB1*04 DQB1*03	134	0,097	9,7	0,9	122	10,32	0,96
DRB1*07 DQB1*02	133	0,096	9,6	0,67	120	10,15	0,69
DRB1*08 DQB1*04	33	0,024	2,4	0,86	25	2,12	0,96
DRB1*09 DQB1*03	13	0,009	0,9	1	19	1,61	1
DRB1*10 DQB1*05	12	0,009	0,9	0,9	13	1,1	1
DRB1*11 DQB1*03	214	0,154	15,4	0,96	140	11,84	0,99
DRB1*12 DQB1*03	22	0,016	1,6	0,87	29	2,45	1
DRB1*13 DQB1*06	130	0,094	9,4	0,63	129	10,91	0,67
DRB1*14 DQB1*05	22	0,016	1,6	0,95	17	1,44	1
DRB1*15 DQB1*06	186	0,134	13,4	0,93	160	13,54	0,95
DRB1*16 DQB1*05	88	0,063	6,3	0,93	47	3,98	1

Наиболее характерными для ростовской популяции являются гаплотипы:
 DRB1*11 – DQB1*03 (HF-0,154; D' – 0,96),
 DRB1*15 – DQB1*06 (HF – 0,134; D' – 0,93),
 DRB1*01 – DQB1*05 (HF – 0,104; D' – 1,0),
 DRB1*04 – DQB1*03 (HF – 0,097; D' – 0,9).

Анализ двухлокусных гаплотипов популяций русских г. Ростова и Челябинской области [8], не выявил различий по частоте неравновесного сцепления, обе популяции имели высокую частоту ($D' \geq 0,9 - 1,0$).

Отмечено незначительное отклонение в частоте гаплотипа DRB1*11-DQB1*03. В ростовской популяции он встречался несколько чаще (15,4 %) чем в челябинской области (11,84 %).

Результаты межпопуляционного анализа иммуногенетических характеристик генов HLA II класса русских г. Ростова-на-Дону подтвердили сходство с анализируемыми популяциями русских в других регионах России.

Выводы:

1. Установлена частота распределения генов HLA II класса DRB1*, DQB1*, гаплотипов HLA DRB1* – DQB1*, величина

их неравновесного сцепления у русских жителей г. Ростова-на-Дону (доноры регистра ГСК).

2. Характер распределения генов HLA DRB1*, DQB1*, двухлокусных гаплотипов у жителей г. Ростова-на-Дону соответствует аналогичным данным для лиц европейской расы, и это позволяет отнести ростовскую популяцию к европеоидам.

3. Полученные данные могут быть использованы для успешного поиска неродственных доноров костного мозга и в качестве контрольной группы в научных исследованиях по теме «HLA и болезни», в этнологии для определения генетического родства между популяциями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хаитов Р. М., Алексеев Л. П., Болдырева М. Н., Сароянц Л. В. Полиморфизм генов иммунного ответа и его роль в противомикробной защите //Иммунология. 2013. № 3. С. 132 – 143
2. Алексеев Л. П., Дедов И. И., Болдырева М. Н. и др. HLA-гены-маркеры инсулинозависимого сахарного диабета, этнические аспекты. //Иммунология. 2003. № 5. С. 308 – 311.
3. Зарецкая Ю. М. Клиническая иммуногенетика. М. 1983.
4. Болдырева М. Н., Алексеев Л. П., Хаитов Р. М. Генетическое разнообразие России и СНГ. I. Русские. //Иммунология. 2005. № 5. С. 260 – 267.
5. Болдырева М. Н., Гуськова И. А., Богатова О. В. и др. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. II. Народов европейской части. //Иммунология. 2006. № 4. С. 98 – 102.
6. Болдырева М. Н., Гуськова И. А., Богатова О. В. HLA-генетическое разнообразие России и СНГ. III Народы Евразии. //Иммунология. 2006. № 6. С. 324 – 329.
7. Сулова Т. А., Бурмистрова А. Л., Хромова Е. Б. Частота генов HLA-A, — D, DR в популяциях татар Челябинской области в сравнении с другими этносами региона. //Вестник Челябинского государственного университета. 2013. № 7. Биология. Вып. 2. С. 14 – 17.
8. Сулова Т. А., Вавилов М. Н., Сташкевич Д. С. «и др.». Иммуногенетический профиль (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1) популяции русских Челябинской области. // Гематология и трансфузиология. 2015. № 3. С. 25 – 35.
9. Знакомьтесь: народы Дона. Ростов-на-Дону. Изд. АПСН СКНЦ ВШ ЮФУ 2009. С. 244.
10. Пронштейн А. П.. История Дона с древнейших времен до Великой Октябрьской Социалистической революции. Издательство Ростовского-на-Дону государственного университета, 1965.
11. Бурмистрова А. Л., Девальд И. В., Черешнев В. А. «и др.». Иммуногенетический анализ башкирской этнической группы Южно-Уральского региона и ассоциация генов HLA I и II классов с ревматоидным артритом у башкир //Иммунология. 2005. № 2. С. 68 – 71.
12. Капустин С. И. Особенности аллельного полиморфизма генов HLA в здоровой популяции Санкт-Петербурга и больных тяжелой апластической анемией. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб, 1998.
13. Чернова М. С. Иммуногенетический профиль популяций Челябинской области (русские, татары, башкиры, нагайбаки) в структуре мировых популяций. Автореф. дис. ... канд. биолог. наук, Челябинск, 2014.
14. Куранов А. Б. Аллельный полиморфизм генов HLA класса II в казахской популяции и его прогностическое значение при ревматоидном артрите и туберкулезе. Дисс. канд. биолог. наук. Москва, 2015.
15. Хамаганова Е. Г., Кузьминова Е. П., Чапова Р. С. и др. HLA-A*/B*/C*/ DRB1*/DQB1* — гены и гаплотипы костного мозга регистра ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, самоопределившиеся как русские. //Гематология и трансфузиология. 2017. № 2. С. 65 – 70.
16. Хидятова И. М., Ишмухаметова А. Т., Лукманова Г. И., Хуснутдинова Э. К. «и др.». Полиморфизм гена HLA DRB1 в популяции волго-уральского региона. //Генетика. 2004. № 2. С. 267 – 271.
17. Antonio Arnaiz-Villena, Jose Palacio-Gruber, Ester Muniz et al. Genetic HLA study of Kurds in Iraq, Iran and Tbilisi (Caucasus, Georgia): Relatedness and Medical Implications. Plos ONE (12)1: e0169929. doi: 10.1371/journal.pone.0169929.
18. Поздеева О. С., Болдырева М. Н., Янкевич Т. Э., Алексеев Л. П.. Гены гистосовместимости II класса в популяции удмуртов. //Иммунология. 2014. № 2. С. 60 – 63.

Пархоменко Т. В., Клыценко О. А., Томсон В. В., Галибин О. В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ Т-ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА КРЫС *in vitro*

Parkhomenko T. V., Klytsenko O. A., Tomson V. V., Galibin O. V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Academician I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University», of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

A STUDY ON THE EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON THE MEMBRANE POTENTIAL OF T-LYMPHOCYTES THYMUS OF RATS *in vitro*

Резюме.

Введение. Эритропоэтин (ЭПО)— физиологический стимулятор эритропоэза. Одним из основных эффектов ЭПО является снижение скорости апоптоза эритроидных клеток-предшественниц в костном мозге. Протекторные свойства ЭПО продемонстрированы при различных заболеваниях в клинических и экспериментальных условиях. Ранее было установлено, что ЭПО оказывает активирующее воздействие на Т-лимфоциты (ТЛЦ), сопровождающееся увеличением количества флуоресцирующих митохондрий в клетке ($n_{m/c}$), и увеличением суммарного трансмембранного потенциала на плазматической ($\Delta\varphi_p$) и митохондриальных мембранах ($\Delta\varphi_m$). Однако остается неясным, какой именно мембранный потенциал реагирует на воздействие ЭПО: $\Delta\varphi_m$, или (и) $\Delta\varphi_p$. Для ответа на этот вопрос мы использовали специфические ингибиторы реакций фосфорилирования в дыхательной цепи.

Цель настоящего исследования — оценка реакции ТЛЦ на ЭПО после воздействия ингибиторов разных классов.

Материалы и методы. Исследовалось влияние ЭПО («Eprex», Cilag) на ТЛЦ крыс *in vitro* после их дезэнергизации несколькими ингибиторами: динитрофенолом (ДНФ) — ингибитором дыхательной цепи и разобщителем окислительного фосфорилирования; пентахлорфенолом (ПХФ) — разобщителем окислительного фосфорилирования; дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД) — ингибитором мембрансвязанной части АТФ-азы митохондриальной мембраны с помощью потенциал-

Abstract

Relevance. Erythropoietin (EPO) — physiological stimulator of erythropoiesis. It activates the mitosis and maturation of red blood cells from progenitor cells erythroid series. One of the main effects of EPO is the slowdown in the rate of apoptosis of erythroid progenitor cells in the bone marrow. Protective properties of EPO demonstrated in various diseases in clinical and experimental conditions. Previously, it was found that activating EPO-effect on T-lymphocytes (TLC) accompanied by an increase in the number of fluorescent mitochondria ($n_{m/c}$) and an increase in the total transmembrane potential at the plasma ($\Delta\varphi_p$) and mitochondrial membranes ($\Delta\varphi_m$). However, it remains unclear which membrane potential reacts to the effect of erythropoietin: $\Delta\varphi_m$ or (and) $\Delta\varphi_p$. To answer this question, we used specific inhibitors of the reactions of phosphorylation in the respiratory chain.

The aim of this work was to investigate the TLC response upon EPO after exposure to different classes of inhibitors.

Materials and methods. We studied EPO (Eprex, Cilag) influence on rat TLC after inhibition its fluorescence by some compounds: dinitrophenol (DNP-uncoupler of oxidative phosphorylation and inhibitor of respiratory chain), pentachlorophenol (PCP-uncoupler of oxidative phosphorylation), N, N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD- inhibitor of Ca^{2+} -dependent mitochondria ATP-ase) by electrical field gradient sensitive probe DSM [4-(p-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium]. Rat TLC were isolated

чувствительного витального флуоресцентного зонда-катиона 4-(*p*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ). ТЛЦ выделяли из тимусов по стандартной методике. Окрашенные ДСМ клетки исследовали на люминесцентном микроскопе («Люам — Р8», ЛОМО, Россия) с использованием термостатированного столика. В каждом препарате измеряли флуоресценцию 50–70 клеток и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции ТЛЦ (\bar{F}). В каждой флуоресцирующей клетке подсчитывали $n_{m/c}$. Статистическую обработку данных экспериментов проводили по коэффициенту корреляции рангов Спирмена.

Результаты и обсуждение. В экспериментах с ТЛЦ из разных тимусов зарегистрировано снижение $n_{m/c}$ и \bar{F} после инкубации со всеми использованными ингибиторами, причем степень и скорость снижения этих параметров зависела от типа ингибитора и длительности инкубации. Реакция ТЛЦ на ДЦКД подтверждает важную роль АТФ — азы в поддержании мембранного митохондриального потенциала. После деэнергизации ТЛЦ под действием ДЦКД, ЭПО восстанавливает ~ 42 % $n_{m/c}$ и ~ 38 % \bar{F} . В заключение следует отметить: ЭПО способен частично восстанавливать поляризацию мембран митохондрий в ТЛЦ, нарушенную в результате воздействия ДЦКД.

Ключевые слова. Эритропоэтин, Т-лимфоциты, энергетическая активность, ингибиторы, потенциалчувствительный витальный флуоресцентный зонд-катион 4-(*p*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ).

Введение. Эритропоэтин (ЭПО) — физиологический стимулятор эритропоэза. Он активирует митоз и созревание эритроцитов из клеток-предшественников эритроцитарного ряда [1]. ЭПО секретируется в почках и в перисинусоидальных клетках печени. Одним из основных эффектов ЭПО является снижение скорости апоптоза эритроидных клеток-предшественниц в костном мозге. Рецепторы к ЭПО обнаружены на клетках нервной ткани, яичников и яичек, матки, гладкомышечных клетках сосудов, кардиомиоцитах, эндотелиоцитах, эпителии легких и почечных канальцев [2]. Рекомбинантный эритропоэтин альфа (Эпобиокрин, Эпрекс, Эпостим) широко используется для коррекции

анемий при различных заболеваниях [3,4,5]. ЭПО связывается с рецептором эритропоэтина на поверхности клеток-предшественников и активирует JAK2^[3] сигнальный каскад [6, 7]. ЭПО увеличивает аффинность колониеобразующих эритроцитарных единиц к макрофагам костного мозга, что усиливает пролиферацию и дифференцировку эритробластов, стимулирует секрецию макрофагами эритробластических островков (ЭО) эндогенного ЭПО и гликозаминогликанов, способствуя формированию эритропоэтического микроокружения, а также подавляет апоптоз эритрокариоцитов в ЭО [8]. При Т.Т. (термическая травма) зафиксирован ПОЛ — ограничивающий эффект ЭПО в лимфоцитах

according to the standard method. The microfluorimetric studies of DSM-stained TLC were performed by means of fluorescent microscope «Lumam R-8», «Lomo», Russia) with thermostatic table. Each specimen was measured 50–70 single cells, mean fluorescence intensity of TLC was calculated (\bar{F}) and $n_{m/c}$. Statistical processing of data the experiments were performed on the range correlation coefficient Spirmen.

Results. In experiments with TLC from different animals was registered a decrease in \bar{F} and $n_{m/c}$ after incubation with all used inhibitors. It was found that difference in decrease velocity of $n_{m/c}$ and of \bar{F} depends on the type of inhibitor and on the duration of incubation. The reaction of TLC on the DCCD confirms the important role of the ATP-ASE in the maintenance of mitochondrial membrane potential. After deenergization of TLC under the action of DCCD, EPO restores ~ 42 % of $n_{m/c}$ and ~ 38 % of \bar{F} .

Conclusion. EPO is able to partially recover the polarization of the mitochondria membranes in TLC violated as a result of exposure to DCCD.

Key words. Erythropoietin, T-lymphocytes, energy activity, inhibitors, electrical field gradient sensitive probe DSM [4-(*p*-dimethylaminostyryl)-1-methylpyridinium].

анемий при различных заболеваниях [3,4,5]. ЭПО связывается с рецептором эритропоэтина на поверхности клеток-предшественников и активирует JAK2^[3] сигнальный каскад [6, 7]. ЭПО увеличивает аффинность колониеобразующих эритроцитарных единиц к макрофагам костного мозга, что усиливает пролиферацию и дифференцировку эритробластов, стимулирует секрецию макрофагами эритробластических островков (ЭО) эндогенного ЭПО и гликозаминогликанов, способствуя формированию эритропоэтического микроокружения, а также подавляет апоптоз эритрокариоцитов в ЭО [8]. При Т.Т. (термическая травма) зафиксирован ПОЛ — ограничивающий эффект ЭПО в лимфоцитах

периферической крови (ПОЛ — перекисное окисление липидов). Можно предположить стимулирующий эффект ЭПО в отношении пролиферации и дифференцировки клеток в ходе лимфопоэза в костном мозге, других органах иммунной системы [9,10]. Протекторные свойства ЭПО, в связи с иммуномодулирующим действием продемонстрированы при различных заболеваниях в клинических и в экспериментальных условиях [11,12,13]. В 2007г был обнаружен модулирующий характер влияния ЭПО на Т-лимфоциты (ТЛЦ), выделенные из тимуса крыс *in vitro* по изменению их энергетического состояния с использованием потенциал чувствительного флуоресцентного зонда [14]. Авторами было установлено, что ЭПО оказывает активирующее воздействие на ТЛЦ, сопровождающееся увеличением количества светящихся митохондрий в клетке ($n_{m/c}$), имеющих протонный потенциал ($\Delta\psi_m$), и (или) ростом внешнего мембранного потенциала ($\Delta\psi$) [15]. Однако остается неясным, какой именно мембранный потенциал реагирует на воздействие ЭПО: $\Delta\psi_m$ или (и) $\Delta\psi$. Для ответа на этот вопрос мы использовали специфические ингибиторы реакций фосфорилирования в дыхательной цепи, которые являются важным инструментом при изучении процессов энергообеспечения в клетках. Цель настоящего исследования — оценка реакции ТЛЦ на ЭПО после воздействия ингибиторов разных классов.

Материалы и методы. Объектом исследования служили ТЛЦ, выделенные из тимусов белых крыс линии Вистар, весом 200 – 300г по известной методике [14]. Полученные клетки помещали в стандартный раствор Хенкса. Состав раствора Хенкса: 0,13 М хлорида натрия, 5,5 М хлорида калия, 1,2 мМ фосфата натрия, 1,0 мМ хлорида кальция, 1,0 мМ хлорида магния, 10,0 мМ глюкозы; рН 7,4 в 100 мл дистиллированной воды. Для верификации клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами применяли тест с трипановым синим. В работе применяли: динитрофенол (ДНФ) (Sigma) — ингибитор дыхательной цепи и разобщитель окислительного фосфорилирования; пентахлорфенол (ПХФ) (Sigma) — разобщитель окислительного фосфорилирования; дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД) (Sigma) — ингибитор мембрансвязанной части АТФ-азы митохондриальной мембраны; ЭПО («Eprex»,

Cilag); потенциал чувствительный флуоресцентный зонд 4-(п-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ), синтезированный в Институте органического синтеза АН Латвии [14]. Опытные образцы суспензии ТЛЦ [$\sim 2 - 3$]. 10^7 клеток/мл] в пробирках типа Эппендорф инкубировали в присутствии ингибиторов в течение 10, 20, 40 мин при 37°C, затем добавляли ЭПО (в конечной концентрации 2 ед./мл), инкубировали далее 30 мин, добавляли зонд ДСМ (конечная концентрация 1,5 мкМ) и продолжали инкубацию еще 20 мин. Конечные концентрации ингибиторов: ДНФ — 0,1 мМ; ПХФ — 1,5 мкМ; ДЦКД — 0,1 мМ. Все ингибиторы растворяли в 70 % этиловом спирте. Отношение объемов добавляемых растворов к исходному объему суспензии клеток не превышало 1:20 соответственно. К контрольным пробам добавляли объемы раствора Хенкса, равные объемам ингибиторов, и после инкубации при 37°C в течение 10, 20, 40 мин, инкубировали с ЭПО (в конечной концентрации 2 ед./мл) 30 мин, далее — с ДСМ в течение 20 мин. Контрольные и опытные образцы ТЛЦ исследовали на люминесцентном микроскопе «Люмам — Р8» (ЛОМО, Россия) при увеличении в 900 раз, с использованием термостатированного столика. Флуоресценцию зонда возбуждали ртутной лампой с длиной волны 405 – 436 нм. Для регистрации флуоресценции использовали фотометрическую насадку ФМЭЛ-1 и интерференционный фильтр с максимумом пропускания 585 нм. Регистрировали величину интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки. Аналоговый сигнал, регистрируемый с помощью вольметра, преобразовывался в цифровой с помощью прибора — аналогового-цифрового преобразователя (АЦП), сконструированного на ЛОМО, Россия. Размер фотометрируемого участка был равен диаметру клетки, т. е. фотометрировали всю клетку целиком. В каждой флуоресцирующей клетке подсчитывали количество светящихся митохондрий ($n_{m/c}$), которые визуальным образом распознавали по характерной гранулярной желтой флуоресценции зонда ДСМ [14]. В каждом препарате измеряли флуоресценцию 50 – 70 клеток и рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции ТЛЦ (Ф_{усл.ед.}). За время измерений в клетках не происходило существенных изменений флуоресцентного сигнала. Фотосъемку препаратов клеток, окрашенных зондом ДСМ, вы-

полняли, используя микроскоп «Люам-Р8» и фотокамеру ТСА-5,0; программный пакет «Микро-Анализ View» (ООО «ЛОМО-Микро-системы», Россия). Статистическую обработку данных экспериментов проводили по коэффициенту корреляции рангов Спирмена. Всего было исследовано 8000 клеток в 160 препаратах. Некоторые предварительные результаты восстанавливающего эффекта ЭПО на ТЛЦ крыс после их обработки ингибиторами опубликованы нами ранее [16].

Результаты и обсуждение. Энергетическая активность каждой исследованной клетки характеризуется интегральной интенсивностью флуоресценции ДСМ в цитоплазме, которая зависит от суммы трансмембранных потенциалов на плазматической и митохондриальной мембранах. Ранее нами было установлено, что ЭПО воздействует на ТЛЦ крыс, изменяя градиенты электрических полей на клеточных мембранах. Lifshitz L. и др. [11], продемонстрировавшие иммуномодулирующие эффекты ЭПО, которые проявлялись на клеточном и гуморальном уровнях иммунной системы, не обнаружили рецепторов ЭПО на лимфоцитах. По данным этих авторов, рецепторы ЭПО имеются на макрофагах костного мозга. Обработка ЭПО этих клеток *in vitro* повышала их фагоцитарную активность и увеличивала экспрессию на клеточной поверхности рецепторов CD116, F4/80 и CD80. Артюховым В. Г. и др. [17] было показано, что активирующее воздействие, например, облучение УФ — светом, индуцирует изменение поверхностного фенотипа ТЛЦ крови человека, вызывая изменение уровня экспрессии антиген — распознающих рецепторных комплексов (CD3-, CD4- и CD8- марке-

ров) и перераспределение их на поверхности иммунокомпетентных клеток с образованием рецепторных кластеров различных типов. Возрастание \bar{F} и $n_{m/c}$ под действием ЭПО в ТЛЦ, скорее всего, $n_{m/c}$ отражает возрастание общей поляризации мембран; поляризация мембран связана с экспрессией поверхностных рецепторов, которая, в свою очередь, обусловлена энергетическим состоянием примембранных комплексов митохондрий вблизи поверхности. [18]. Исходно доля клеток с неповрежденными цитоплазматическими мембранами в данной работе составляла 92 – 96 %. В экспериментах с ТЛЦ из разных тимусов зарегистрировано снижение $n_{m/c}$ и \bar{F} после инкубации со всеми использованными ингибиторами, причем степень и скорость снижения этих параметров зависела от типа ингибитора и длительности инкубации (таблица 1, рис. 1, 2, 3). Максимальный эффект достигался при воздействии ДНФ: уже через 10 мин инкубации светящиеся митохондрии практически отсутствуют в суспензии клеток; \bar{F} также резко снижается; через 20 мин продолжается снижение $n_{m/c}$ и \bar{F} ; через 40 мин светящихся митохондрий не видно, \bar{F} на уровне фона. ЭПО не восстанавливает \bar{F} и $n_{m/c}$. На рис. 1 наглядно продемонстрирована динамика нарастания доли ТЛЦ без флуоресцирующих митохондрий (N_{c-EM} %) под действием ДНФ и отсутствие восстанавливающего эффекта ЭПО. ДНФ является классическим протонофором, который быстро и необратимо снижает одновременно оба компонента электрохимического градиента — электрический и химический, деполаризует мембраны.

Таблица 1

Изменение средней интенсивности флуоресценции (\bar{F} усл. ед.) и числа флуоресцирующих митохондрий на клетку ($n_{m/c}$) в процессе инкубации ТЛЦ с ингибиторами и ЭПО при 37°C.

t, мин	контроль		ТЛЦ + ДНФ		ТЛЦ + ПХФ		ТЛЦ + ДЦКД	
	$n_{m/c}$	\bar{F}	$n_{m/c}$	\bar{F}	$n_{m/c}$	\bar{F}	$n_{m/c}$	\bar{F}
10	10,8 ± 0,8	27,6 ± 2,6	0,5 ± 0,1*	5,7 ± 0,6**	4,4 ± 0,8*	9,6 ± 0,8*	3,3 ± 0,3*	9,2 ± 0,6*
20	9,0 ± 0,7	25,5 ± 2,5	0,4 ± 0,1*	4,5 ± 0,5*	2,8 ± 0,3**	7,0 ± 0,6*	1,9 ± 0,3**	5,5 ± 0,5*
40	8,8 ± 0,6	23,0 ± 2,5	0	2,3 ± 0,3*	0	2,5 ± 0,3*	0	2,8 ± 0,4**
+ЭПО								
30	20,5 ± 1,0	48,3 ± 4,7	0	2,3 ± 0,3*	4,7 ± 0,6*	9,7 ± 0,7*	8,7 ± 0,8**	18,4 ± 0,8**

* — $P < 0,01$, ** — $P < 0,025$; $n_{m/c}$ — среднее число флуоресцирующих митохондрий на клетку в данных временных точках по всем измеренным клеткам; \bar{F} усл. ед. — средние величины флуоресценции в данных временных точках по всем измеренным клеткам. Контроль: ТЛЦ, инкубированные без ингибиторов при 37° С, с добавлением ЭПО через 40 мин инкубации; опыт: ТЛЦ + ДНФ, ТЛЦ + ПХФ, ТЛЦ + ДЦКД — клетки после инкубации с ДНФ, ПХФ и ДЦКД и затем — с ЭПО пр 37°С. Для каждой временной точки приведена величина среднего (M) и ошибка среднего (m).

Через 10 мин инкубации ТЛЦ с ПХФ остается ~ 37 % $n_{m/c}$ и ~ 35 % \bar{F} ; через 20 мин ~ 26 % $n_{m/c}$ и ~ 25 % \bar{F} от контроля; через 40 мин светящихся митохондрий не видно, \bar{F} на уровне фона. На рис. 2 показано изменение доли ТЛЦ без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} , %) под действием ПХФ и эффект ЭПО. Нарастание во времени ингибирующего воздействия ПХФ на ТЛЦ практически линейно и частично обратимо в присутствии ЭПО, который восстанавливает ~ 23 % $n_{m/c}$ и ~ 20 % \bar{F} , что примерно соответствует доле зрелых ТЛЦ в суспензии клеток тимуса. Можно предположить, что эффект обратимости является кажущимся, поскольку под действием ЭПО активитуются те клетки, которые исходно имели высокий $\Delta\psi$, и ПХФ в них практиче-

ски не проникает, т. к. имеет отрицательный заряд и не повреждает мембрану снаружи, как в случае ДНФ.

Десятиминутная инкубация ТЛЦ с ДЦКД оставляет ~ 30 % флуоресцирующих $n_{m/c}$ и ~ 33 % \bar{F} . После 20 мин воздействия ДЦКД в суспензии регистрируется ~ 18 % $n_{m/c}$ и ~ 20 % \bar{F} , происходит резкая деэнергизация митохондрий. Через 40 мин светящихся митохондрий не видно, \bar{F} на уровне фона. 30-минутная инкубация с ЭПО восстанавливает ~ 42 % $n_{m/c}$ и ~ 38 % \bar{F} от контрольного уровня. Рис. 3 демонстрирует изменение доли ТЛЦ без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} , %) под действием ДЦКД и восстанавливающее воздействие ЭПО.

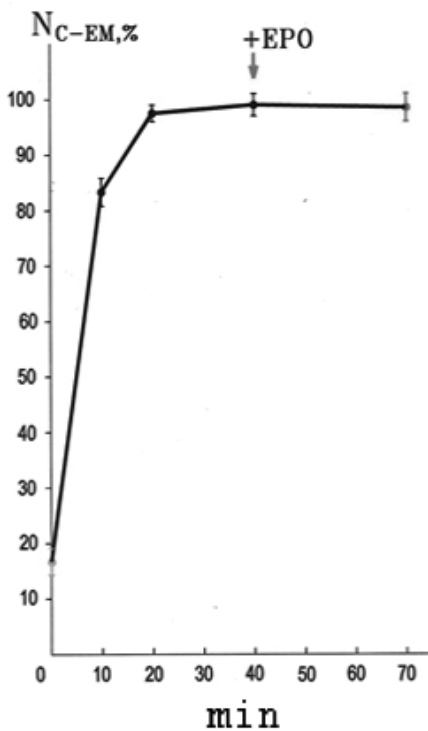


Рис. 1

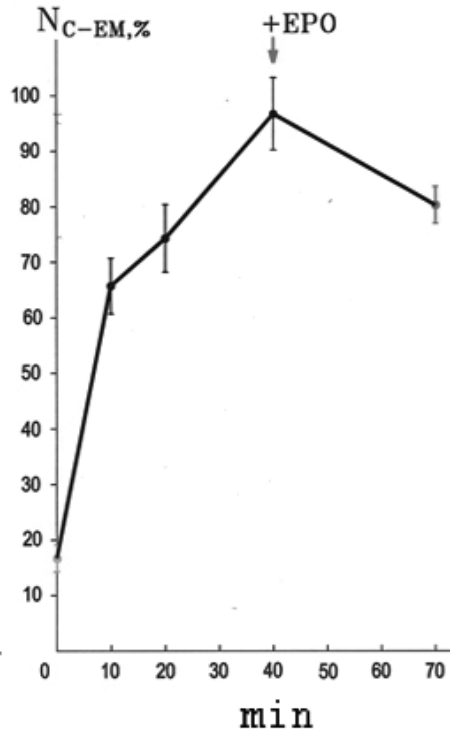


Рис. 2

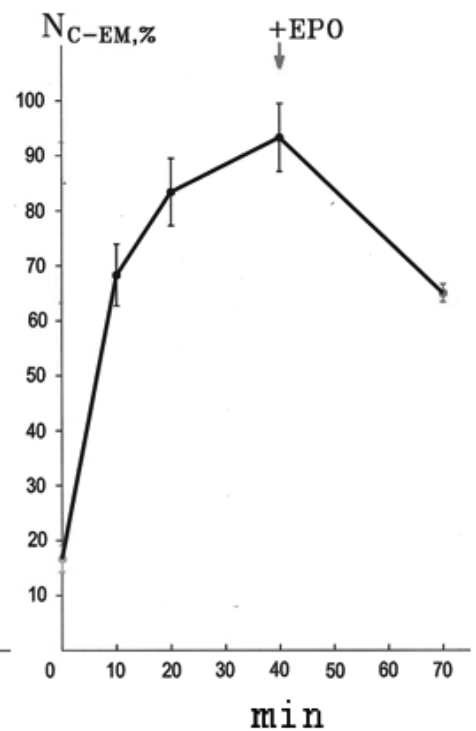


Рис. 3

Изменение доли Т-лимфоцитов без флуоресцирующих митохондрий (N_{C-EM} , %) в процессе инкубации с ДНФ (Рис. 1), с ПХФ (Рис. 2), с ДЦКД (Рис. 3) и влияние ЭПО при 37°C. По оси абсцисс отложено время в минутах; по оси ординат — средние величины долей Т-лимфоцитов без флуоресцирующих митохондрий для каждой временной точки по всем измеренным клеткам. Доверительные интервалы при $P \leq 0,05$.

F0F1-АТФ — аза митохондрий является сложным липопротеидным комплексом и состоит из гидрофильного каталитического центра F1 и мембранного сектора F0 [19]. ДЦКД — специфический ингибитор транслокации протонов в F0F1 АТФ-азе митохондрий [20] который ковалентно связывается с протеолипидом — одной из субъединиц

F0. В опытах с меченым ДЦКД было установлено, что ДЦКД действует на протеолипид, связываясь всего с одним остатком глутаминовой кислоты GLY-59 [21]. ДЦКД ингибирует АТФ — азу в мембранах митохондрий, за счет этого снижается $n_{m/c}$ и общая \bar{F} . Реакция ТЛЦ на воздействие ДЦКД подтверждает важную роль АТФ-азы в поддержании

мембранного митохондриального потенциала. Эффект дезэнергизации митохондрий под действием ДЦКД обратим в присутствии ЭПО, если судить по среднему числу митохондрий в восстановленных ТЛЦ. Это может свидетельствовать о способности ЭПО частично восстанавливать поляризацию митохондрий

альных мембран. На *рис. 4, 5, 6* изображены ТЛЦ, окрашенные зондом ДСМ: (*Рис. 4* — исходный образец после инкубации с ЭПО; *Рис. 5* — ТЛЦ после 40-минутной инкубации с ДЦКД; *Рис. 6* — ТЛЦ после воздействия ЭПО на обработанные ДЦКД клетки).



Рис. 4



Рис. 5

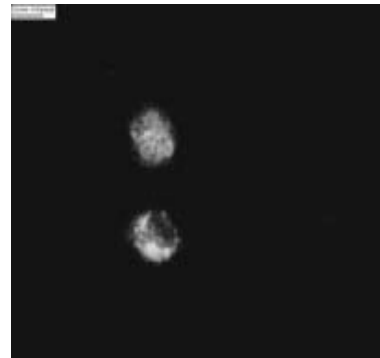


Рис. 6

Т-лимфоциты из тимуса крысы, окрашенные зондом ДСМ. *Рис. 4* — исходный образец после инкубации с ЭПО, F = 52,0 усл. ед.; *Рис. 5* — ТЛЦ после 40-минутной инкубации с ДЦКД F = 3,0 усл. ед.; *Рис. 6* — ТЛЦ после воздействия ЭПО на обработанные ДЦКД клетки, F = 20,0 усл. ед.

Возможно, что механизм избирательно обратимого воздействия ЭПО после ДЦКД на ТЛЦ объясняется различным содержанием и состоянием F₀F₁ АТФ-азы в мембранах митохондрий клеток разной степени рецепторной зрелости и связанной с этим метаболической реактивностью. Наши данные свидетельствуют о том, что ЭПО влияет на метаболизм ТЛЦ, связанный с энергетической активностью митохондрий.

Выводы. Максимальный восстанавливающий эффект эритропоетина на Т-лимфоциты наблюдается после воздействия ингибитора АТФ-азы — дицклогексилкарбодиимида, что свидетельствует о существенной роли протонной помпы АТФ — азы в создании градиента на мембранах митохондрий и о способности эритропоетина частично восстанавливать поляризацию мембран митохондрий в Т-лимфоцитах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jelkmann W., Gross A. J. (Eds.) Erythropoietin. // Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1989, 180 p.
2. Осиков М. В., Григорьев Т. А., Федосов А. А., Козочкин Д. А., Ильиных М. А. Влияние эритропоетина на функциональную активность тромбоцитов. // Современные проблемы науки и образования. — 2012. — № 6.; URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_23220530_33460976.pdf.
3. Бакшеев В. И., Коломоец Н. М. Эритропоэтин в клинической практике. // Клиническая медицина. 2007; 85(9): 30 – 37.
4. Biggar P, Kim GH. Treatment of renal anemia: Erythropoiesis stimulating agents and beyond. // Kidney Res Clin Pract. 2017; 36(3): 209 – 223.
5. Bonomini M¹, Del Vecchio L², Sirolli V³, Locatelli F². New Treatment Approaches for the Anemia of CKD. // Am J Kidney Dis. 2016; 67(1): 133 – 42.
6. Livnah O, Johnson DL, Stura EA., et al. An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation. // Nature Structural & Molecular Biology. 1998; 5 (11): 993-1004.
7. Сараева Н. О. Использование рекомбинантного эритропоетина в гематологической практике. // Сибирский медицинский журнал. 2006; 64(6): 5 – 10.

8. Захаров Ю. М., Мельников И. Ю., Тишевская Н. В., Шевяков С. А. Исследование роли межклеточных взаимодействий в регуляции эритропоэза в эритробластических островках костного мозга. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2015; 55(4): 59 – 62.
9. Осиков М. В., Симонян Е. В., Седгалина О. Т., Федосов А. А. Механизм влияния эритропоэтина на количественный состав лимфоцитов крови при экспериментальной термической травме. // Современные проблемы науки и образования. — 2016. — № 2 URL: https://elibrary.ru/download/elibrary_25869790_84106576.pdf.
10. Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, et al. Erythropoietin reduces acute lung injury and multiple organ failure/dysfunction associated to a scald-burn inflammatory injury in the rat. // *Inflammation*. 2015; 38(1):312 – 26.
11. Lifshitz L., Avneon M., Prutchi-Sagiv S., Katz O., Gassmann M., Mittelman M., Neuman D. // Immunomodulatory functions of Erythropoietin. *Focus uni-luebeck Supplement*. 2009; 28.
12. Todosenko NM¹, Shmarov VA¹, Malashchenko VV¹, et al. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. // *Int Immunopharmacol*. 2016; 36:277 – 281.
13. Wang S^{1,2}, Zhang C^{1,2}, Li J^{1,2}, et al. Erythropoietin protects against rhabdomyolysis-induced acute kidney injury by modulating macrophage polarization. // *Cell Death Dis*. 2017; 8(4): e2725.
14. Morozova G. I., Parkhomenko T. V., Klitsenko O. A., Tomson V. V. Stimulating effect of erythropoietin on thymocyte energetics established in vitro with a potential-sensitive fluorescent probe in the mitochondria. // *Biochem. Suppl. Series A: Membr Cell Biology*. 2007; 1 (4):325 – 330.
15. Parkhomenko T. V., Morozova G. I., Klytsenko O. A., Tomson V. V. Quantitative evaluation of erythropoietin (EPO) influence on rat T-lymphocytes. // *Annals of Hematology* 2000; 79(5): B8.
16. Parkhomenko T. V., Morozova G. I., Klytsenko O. A., Tomson V. V. Evaluation of restoring erythropoietin (EPO) effect on rat T-lymphocytes after their treatment with some inhibitors in vitro. // *Annals of Hematology*. 2003; 82 (6): S114.
17. Артюхов В. Г., Путинцева О. В., Брагина В. А., Пашков М. В., Василенко Д. В. Флюоресцентные методы в исследовании УФ-индуцированных изменений структурно-функционального состояния лимфоцитов крови человека. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2012; 153 (6): 891 – 895.
18. Parkhomenko T. V., Morozova G. I., Klitsenko O. A., Tomson V. V. The erythropoietin (EPO) response of cells isolated from rat thymuses in vitro. // *Focus uni-luebeck Supplement*. 2009:32.
19. Futai M., Noumi T., Maeda M. ATP — synthase (H⁺-ATP — ASE) — results by combined biochemical and molecular biological approaches. // *Annual Review of Biochemistry*. 1989; 58:111 – 136.
20. Clejan L., Bosch C. G., Beattie D. S. Inhibition by dicyclohexylcarbodiimide of proton ejection but not electron-transfer in rat-liver mitochondria. // *Journal of Biological Chemistry*. 1984; 259 (21):13017 – 13020.
21. Linnane A., Lukins H., Nagley P, et al. Assembly of the yeast mitochondrial H⁺-ATP-Ase correlative studies involving gene sequencing and immunochemical probes of assembly. // *Achievements and perspectives of mitochondrial research*. 1985; 1(Bioenergetics):211 – 222.

Данные для корреспонденции:

Пархоменко Татьяна Васильевна,
ст. научн. сотр. лаборатории патоморфологии
НИЦ ГБОУ ВПО СПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России;
197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, д. 6/8,
тел/факс: +7 (812) 499-71-54,
e-mail: parhomenkotv@1spbgnu.ru.

Абдрахимова А. Р., Кузьминова Е. П., Урыбин И. Ю., Хамаганова Е. Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА HLA-DPB1 У ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РЕГИСТРА «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ», САМООПРЕДЕЛИВШИХСЯ КАК РУССКИЕ

Введение. Трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является методом спасения многих пациентов с заболеваниями системы крови. У большинства больных, нуждающихся в алло-ТГСК, отсутствует HLA-идентичный родственник донор, поэтому для них необходим поиск неродственного донора. Совпадение донора и реципиента по аллелям генов HLA-A, — B, — C, — DRB1, — DQB1 повышает выживаемость после алло-ТГСК. Селекция неродственного донора по гену HLA-DPB1 не является обязательной из-за низкого уровня экспрессии молекул DP. Однако слабое неравновесное сцепление локуса HLA-DP с другими генами HLA-системы ведёт к тому, что несовпадение по аллелям HLA-DPB1 наблюдается при ~80 % неродственных алло-ТГСК. Классификация HLA-DPB1-аллелей по группам TCE (Т-клеточных эпитопов) позволяет идентифицировать пермиссивные (допустимые) комбинации донор-реципиент, ассоциирующиеся с низким клиническим риском, и непермиссивные (недопустимые) комбинации с высоким клиническим риском. В доступной литературе имеются лишь единичные работы, изучавшие распределение аллелей гена HLA-DPB1 в российских популяциях — у жителей Санкт-Петербурга и Тувы.

Цель исследования — провести анализ распределения аллелей гена HLA-DPB1 и групп TCE у доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как русские.

Материалы и методы. По гену DPB1 HLA-типированы 202 донора регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившиеся как русские, из них мужчин 73 (36 %), женщин 129 (64 %). Средний возраст доноров составил 30 лет. ДНК получали из венозной крови, взятой в пробирки с ЭДТА. Выделение ДНК проводили с помощью набора «Arrow Blood DNA 200» (NorDiag ASA, Norway) на приборе для автоматического выделения нуклеиновых кислот NorDiagArrow в соответствии с реко-

мендациями производителя. Генотипирование HLA-DPB1 проводилось двумя методами: PCR-SSO (полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфическими олигонуклеотидами) с использованием наборов LIFECODES на платформе Luminex; PCR-SSP (полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфическими праймерами) с использованием наборов Olerup (Olerup SSP, Sweden). Определение частот HLA-DPB1 аллелей проводилось с использованием компьютерной программы «Арлекин», версия 3.5. Аллели DPB1 были классифицированы в соответствии с TCE3 алгоритмом, доступном на www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html. Частоты TCE групп определялись как сумма частот аллелей, составляющих группу.

Результаты. У 202 доноров регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как русские, выявлено 20 различных аллелей HLA-DPB1. Преобладающим являлся аллель DPB1*04:01, его частота составляла 0,386 (39 %). С относительно высокой частотой выявлялись аллели DPB1*02:01 – 0,163 (16 %), DPB1*04:02 – 0,151 (15 %) и DPB1*03:01 – 0,116 (12 %), что характерно для большинства европейских популяций. На все другие установленные DPB1-аллели приходилось 18 %.

Выявленные аллели были классифицированы по степени иммуногенности в соответствии с TCE3 алгоритмом. Наиболее частотной у наших доноров являлась группа слабой иммуногенности (TCE3) — 0,827 (83 %), ее составили аллели DPB1*01:01, DPB1*02:01, DPB1*02:02, DPB1*04:01, DPB1*04:02, DPB1*05:01, DPB1*11:01, DPB1*13:01, DPB1*15:01, DPB1*16:01, DPB1*20:01, DPB1*23:01, DPB1*105:01, в группу промежуточной иммуногенности (TCE2) входили аллели DPB1*03:01, DPB1*06:01, DPB1*14:01, DPB1*19:01, их частота – 0,134 (13 %), к высокоиммуногенной группе (TCE1) относились аллели DPB1*09:01, DPB1*10:01, DPB1*17:01, на них приходилось только 0,039 (4 %). Высокая частота группы слабой иммуногенности

(ТСЕЗ) объясняется вхождением в нее аллелей *DPB1*02:01*, *DPB1*04:01*, *DPB1*04:02*, обладающих в нашей выборке.

Выводы. Как и в большинстве европейских популяций, у доноров регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как русские, преобладают аллели *DPB1*04:01*, *DPB1*04:02*, *DPB1*02:01*, *DPB1*03:01*. Носителями *DPB1*-аллелей повышенной иммуногенности (группы ТСЕ1+ТСЕ2) являются 17 % доноров

регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как русские. Если больной и донор относятся к разным ТСЕ-группам, при наличии у больного нескольких *HLA-A**, *—B**, *—C**, *—DRB1**, *—DQB1**- совместимых доноров типирование гена *HLA-DPB1* позволяет исключить доноров-носителей потенциально опасных (иммуногенных) аллелей этого гена, что может способствовать увеличению эффективности алло-ТГСК.

Балашова В. А., Ругаль В. И., Бессмельцев С. С., Грицаев С. В., Волошин С. В., Семенова Н. Ю., Чубукина Ж. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ ЧИСЛОМ КОЛОНИЕОБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК И CD34-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГСК В АФЕРЕЗНОМ ПРОДУКТЕ МОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Введение. Высокодозная химиотерапия (ВХТ) с последующей аутотрансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК) широко применяется в лечении больных множественной миеломой (ММ) и злокачественными лимфомами (ЗЛ). Основным источником гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является периферическая кровь (ПК), обогащенная мобилизованными из костного мозга ГСК. После мобилизации ПК подвергают аппаратному цитаферезу, и заготовленную клеточную взвесь замораживают. После ее размораживания осуществляют АутоТГСК. Успех трансплантации зависит от эффективности мобилизации, количества, качества и функции ГСК. Маркером ГСК является антиген CD34 и количество CD34+ клеток определяет пригодность трансплантата. От дозы перелитых CD34+ клеток зависит успешность трансплантации, а именно, сроки восстановления гемопоэза. Однако успех трансплантации зависит не только от количества перелитых CD34+ клеток, но также от их функциональной активности. Показателем этой активности является способность CD34+ ГСК формировать колонии в условиях клеточных культур. Определение колониеобразующей способности (КОС) ГСК позволяет оценивать потенциал кроветворного пула трансплантата.

Цель. Определение корреляции между количеством CD34+ ГСК и числом колониео-

бразующих единиц (КОЕ) в культуре клеток в одних и тех же образцах продукта афереза ПК до и после криоконсервирования у больных множественной миеломой ММ и ЗЛ с тем, чтобы оценить клиническую значимость этих показателей.

Материал и методы. Материалом для исследования послужили образцы клеточной взвеси аферезного продукта ПК до и после консервирования и клеточные культуры 25 больных ЗЛ и 32 больных ММ, которым была выполнена АутоТГСК. Для сопоставления результатов оценивали число CD34+ ГСК и количество колоний в одной и той же единице объема — в 100 000 клеток исследуемого аферезного продукта.

В процессе исследования использовались: метод мобилизации клеток из костного мозга; метод аппаратного цитафереза; метод культивирования клеток в полной культуральной среде MethoCultH4435 на основе метилцеллюлозы; метод проточной цитометрии для определения числа CD34+-клеток в продукте афереза мобилизованной ПК.

Результаты. В результате проведенного исследования была выявлена статистически значимая прямая корреляция между количеством CD34+ ГСК и числом всех КОЕ до и после криоконсервирования у больных ЗЛ (коэффициент Спирмена +0,53). Также обнаружена статистически значимая корреляция между

числом CD34+ клеток и гранулоцито-макрофагальных КОЕ в культуре клеток у больных ММ и ЗЛ до криоконсервирования (коэффициент Спирмена +0,312 и +0,302).

Выводы. Таким образом, можно утверждать, что показатели КОС клеток, используемой для учета функциональной активности

ГСК, и количество CD34+клеток являются дополняющими друг друга характеристиками пролиферативного пула трансплантата, и что для оценки количественного и качественно-го состояния ауто трансплантата необходимо использование обоих методов исследования.

Белянская Ю. В., Полякова А. П., Волкова О. Я.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

ОЦЕНКА ГЕМОПОЭТИЧЕСКОГО ХИМЕРИЗМА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ГАПЛОИДЕНТИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является высокотехнологичным методом лечения различных онкогематологических заболеваний, широко применяемым в настоящее время. В связи со значительными трудностями подбора полностью совместимого донора, в последние годы получила распространение ТГСК от гаплоидентичного родственного донора (гапло-ТГСК). Данный вид трансплантации сопровождается повышенным риском осложнений, в числе которых неприживление трансплантата, а также развитие острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина», приводящей в ряде случаев к отторжению аллотрансплантата. Для оценки приживления трансплантата после ТГСК применяется определение гемопоэтического химеризма (ГХ) на разных сроках после трансплантации.

Целью настоящего исследования была сравнительная оценка ГХ у пациентов после аллогенной ТГСК от совместимого или гаплоидентичного донора.

Материалы и методы. Исследование ГХ проводилось у 101 пациента, перенесшего аллогенную ТГСК. Всего было выполнено 84 гаплоидентичные трансплантации (из них 8 повторных) и 28 — от HLA-совместимого донора (в том числе 3 — неродственные и 3 повторные родственные). Количественная оценка ГХ выполнялась методом фрагментного анализа коротких tandemных повторов нуклеотидов (STR — short tandem repeats) с помощью разработанной нами диагностической панели. Методика определения ГХ включала в себя

два этапа: скрининг — определение информативных STR локусов и мониторинг ГХ на разных сроках после ТГСК. Первое определение ГХ выполнялось в день приживления трансплантата (13 – 17-й день после ТГСК), затем на 30-й день (D+30) и далее с периодичностью один раз в месяц на протяжении 1 года. Отсутствие донорского химеризма (ДХ) на D+30 после ТГСК расценивалось как первичное неприживление трансплантата (ПНТ), ДХ менее 95 % — как неполное приживление (НПТ), а снижение ДХ позднее 30 дня после проведенной трансплантации — как вторичное отторжение (ВОТ).

Результаты. В группе пациентов, перенесших гапло-ТГСК, полный ДХ на D+30 наблюдался в 79,8 % (у 67 пациентов), ПНТ — в 7,1 % случаев (6 человек), смешанный ГХ ниже 95 %, свидетельствующий о НПТ — у 11 человек (13,1 %). Среди пациентов после аллогенной совместимой трансплантации полный ДХ выявлялся в 85,7 % случаев (у 24 человек), НПТ — у 4 пациентов (14,3 %). При этом ПНТ в этой группе обнаружено не было. В обеих исследуемых группах ВОТ регистрировалось с равной частотой: 26,2 % при гапло-ТГСК и 25,0 % при совместимой трансплантации.

Выводы. Сравнительный анализ полученных данных показал отсутствие значимых отличий в исходах гаплоидентичных и совместимых аллогенных ТГСК у обследованных пациентов. Различия в частоте случаев ПНТ в исследуемых группах свидетельствуют о повышенном риске данного посттрансплантационного осложнения у пациентов после гапло-ТГСК.

**Беркос А. С., Терентьева М. А., Беляева Е. В., Ерохина Л. В.,
Бакай В. В., Моисеева Л. М., Бубнова Л. Н.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

**ПОДБОР РОДСТВЕННОГО И НЕРОДСТВЕННОГО ДОНОРА ГСК
ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ КЛИНИКИ РОССИЙСКОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ**

Введение. Несмотря на то, что поиск HLA идентичного донора среди сиблингов пациентов остаётся основным источником подбора, выявление совместимого неродственного донора ГСК среди потенциальных доноров регистра является единственным способом, позволяющим проведение трансплантации костного мозга пациентам, не имеющим HLA-идентичного родственного донора. В соответствии с законами кодоминантного наследования вероятность обнаружения в семье двух HLA идентичных сиблингов составляет 25 %. При этом можно предположить, что вероятность выявления совместимого сиблинга в семьях с количеством детей более двух может увеличиваться.

Цель. Анализ результатов поиска HLA-идентичного родственного и HLA-совместимого неродственного донора ГСК для пациентов гематологической клиники ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Материалы и методы. Было проведено HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 типирование 200 больных гемобластозами, 262 их сиблингов для подбора родственного донора, а также 21 пациента для подбора неродственного донора в отечественном объединённом регистре (регистр), включающем около 80 тысяч потенциальных доноров костного мозга. Молекулярное типирование проводилось методом

SSP с использованием наборов сиквенс-специфических праймеров фирмы «Protrans».

Результаты. Для 61 пациента (31 %) был обнаружен сиблинг, полностью совпадающий по антигенам HLA. В семьях с количеством детей более двух обнаружено значительное увеличение частоты выявления HLA совместимого сиблинга по сравнению с семьями с двумя детьми (50 % и 25 % соответственно). Частота встречаемости идентичных, гаплоидентичных и полностью отличающихся по фенотипу сиблингов соответствовала классическому менделевскому распределению (24 %, 51 % и 25 % соответственно).

Для 7 (31 %) пациентов, нуждавшихся в подборе неродственного донора, в регистре было обнаружено 16 HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 (базовое разрешение) совместимых доноров. Для 3 пациентов подобранные доноры в дальнейшем оказались совместимыми и на уровне высокого разрешения.

Выводы. Полученные результаты в основном согласуются со статистикой подборов родственных и неродственных доноров в других трансплантационных центрах. Важно отметить, что поиск HLA-совместимых неродственных доноров даже в относительно небольшом регистре для пациентов, не имеющих HLA-идентичного сиблинга, может быть достаточно успешным.

Блау Игорь-Вольфганг

Университетская клиника Шарите, Берлин, Германия

**КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ
И АЛЛОГЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СТВОЛОВЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

Аллогенная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток приводит к замене кроветворения и созданию новой иммунной системы. Иммунные клетки донора, особенно, Т-клетки, распознают опухолевые анти-

гены реципиента и уничтожают остаточный лейкозный клон. Это хорошо известный эффект — реакция «трансплантат против лейкемии» (РТПЛ). Изучение РТПЛ явилось основой для развития клеточной терапии.

Первым клиническим применением клеточной терапии было переливание лимфоцитов донора (Donor Lymphocyte Infusion, DLI), предложенное в конце 80-х годов И. Колбом и опубликованное в 1990 году. DLI подтвердила эффективность иммунной Т-клеточной терапии сначала у пациентов с хроническим миелолейкозом, и позже у больных с опухолями кроветворной системы, особенно, с низкой пролиферативной активностью, такими как лимфомы низкой степени злокачественности (Champlin, 2001).

В течение последних 20 лет происходит накопление опыта по возможности применения генной терапии в лечении опухолевых заболеваний кроветворения. В девяностые годы 20 века были опубликованы данные, что трансфекция генов человека с использованием ретровирусов в качестве вектора к CD34-положительным стволовым клеткам в некоторых случаях привела к развитию острого Т-клеточного лейкоза через стадию длительной моноклональной лимфопролиферации. В этих случаях генная терапия была применена для лечения больных с врожденной незлокачественной патологией (Adenosine deaminase (ADA) deficiency). После такой серьезной неудачи исследования были сосредоточены на развитии контролируемой трансфекции генов, особенно в Т-клетках, чтобы научиться направлять их действие против

опухолевых антигенов без развития неконтролируемой моноклональной пролиферации трансфецированных клеток.

Недавно стали развиваться направления, объединяющие оба этих принципа, клеточную терапию и применение генетически модифицированных Т-клеток доноров. Одним из них является хорошо известная и введенная в клиническую практику терапия CAR-T-клетками с использованием модифицированных Т-клеток против CD19, но также и против других антигенов, например CD269 (BCMA). Недавно разработано так называемое «второе поколение» CAR-T-клеток. На последнем международном гематологическом конгрессе (ASH 2017) было представлено много новых подходов. Один из протоколов включает в себя два этапа Т-клеточной терапии с аутологичными и аллогенными трансфецированными клетками. Другие группы исследователей используют следующий подход: активация естественного, обусловленного HLA-молекулами Т-клеточного иммунитета против опухолевых антигенов. В нашей клинике мы разрабатываем протокол генетической модификации Т-клеток против MAGEA1 — опухолевого антигена, который расположен на поверхностях клеток некоторых опухолей, в том числе и на миеломных плазматических клетках. В докладе будут представлен опыт по разработке этого протокола.

Блау Ольга Владимировна

Университетская клиника Шарите, Берлин, Германия

ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЙ ХИМЕРИЗМ В КЛЕТОЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ У БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СТВОЛОВЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Аллогенная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток (аллоТСГК) эффективно применяется для лечения широкого спектра как злокачественных, так и незлокачественных заболеваний. Своевременное и эффективное приживление стволовых клеток доноров является важной предпосылкой для окончательного клинического успеха аллоТСГК как с точки зрения восстановления иммунной системы, снижения опасности рецидива, так и с точки зрения борьбы иммунной системы трансплантата против

остаточных злокачественных клеток. Изучение гемопоэтического химеризма после аллоТСГК является рутинным методом для оценки приживления трансплантата, раннего выявления слабости или отторжения трансплантата, а также рецидива заболевания.

Мониторинг химеризма в отдельных клеточных популяциях повышает чувствительность и специфичность молекулярного исследования. Применение предварительной селекции клеточных популяций позволяет выявлять в них остаточные клетки реципи-

ента даже при наличии полного донорского химеризма в общей популяции лейкоцитов. Рецидив заболевания остается основным осложнением после аллоТСГК, особенно у больных с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ). Было показано, что уменьшение донорского химеризма в субпопуляциях молодых клеток (таких как CD34+) позволяет обнаружить рецидив заболевания значительно раньше, до появления развернутой клинической картины. Кроме того, больные с высоким риском ОМЛ, которые составляют большую группу больных, нуждающихся в аллоТСГК, часто не имеют опухолевых специфических маркеров для анализа минимальной остаточной болезни. В таких ситуациях анализ гемопоэтического химеризма в клеточных популяциях остается методом выбора при контроле за эффективностью лечения.

Длительное персистенция смешанного химеризма после аллоТСГК — достаточно часто наблюдаемый феномен у больных с незлокачественными заболеваниями, хроническими лимфопролиферативными заболеваниями, а также у пациентов после применения режимов кондиционирования со сниженной интенсивностью. Несмотря на то, что смешанный химеризм может предполагать неприживление трансплантата с возможным возвратом гемопоэза пациента, долгосрочное сосуществование клеток пациентов и донора часто ассоциируется с развитием статуса иммунологической толерантности, опосредуемой регуляторны-

ми Т-клетками. Удаление Т-клеток (in vivo или ex vivo) может быть использовано для предотвращения отторжения трансплантата и развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), но также может приводить к задержке воссоздания иммунных клеток. РТПХ является одним из наиболее частых и серьезных осложнений после аллоТСГК. Ранняя диагностика этого осложнения и его своевременное лечение увеличивают долгосрочную выживаемость больных. Продолжительный мониторинг химеризма в CD3+ Т-клетках может быть применен для прогнозирования развития РТПХ.

В настоящее время «золотым стандартом» для изучения гемопоэтического химеризма являются методы, основанные на анализе STR (short tandem repeat) с применением капиллярного электрофореза. Этот метод был первоначально разработан для судебных целей и имеет ряд преимуществ, в том числе, высокий уровень стандартизации, надежности и эффективности времени и затрат. Однако недостатком метода является его внутренняя ограниченная чувствительность от 1% до 3%. Эта проблема может быть преодолена использованием количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). В последние годы появилось много коммерчески разработанных методов, основанных на qPCR. Высокая чувствительность таких методов делает исследование периферической крови не менее показательными и специфичными, чем анализ химеризма в костном мозге.

**Ищенкова И. В.¹, Кудинова Э. Е.¹, Савченко О. А.¹, Труфанова Т. И.¹,
Шатохин Ю. В.², Рябикина Е. В.², Снежко И. В.², Алавердян А. И.²**

¹ Государственное бюджетное учреждение Ростовской области «Станция переливания крови», г. Ростов-на-Дону

² Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ростов-на-Дону

ГЕНЫ HLA II КЛАССА DRB1* И DQB1* У ДОНОРОВ РЕГИСТРА ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ

Введение. Изучение HLA-профиля здорового населения популяций в пределах одной страны, ее регионах и в разных странах мира, является важным для практической медицины, в частности, для решения проблем, связанных с аллогенной трансплантацией костного мозга. Удобной контрольной группой, отражающей иммуногенетическую характе-

ристику популяции, могут быть доноры гемопоэтических стволовых клеток, с учетом их этнической принадлежности. К настоящему времени изучено и популяционное разнообразие русских и других народов, проживающих в различных регионах России и за рубежом. В Ростовской области, расположенной в Европейской части России — в Южном фе-

деральном округе, исследование генов HLA II класса не проводилось.

Основным этносом Ростовской области являются русские, однако она относится к полиэтническим регионам вследствие своего географического положения и истории заселения. Заселение низовья Дона и Приазовья активно происходило в XVI – XVIII веках. На Дон переселялись в основном беглые великорусские крестьяне, калмыки, поляки, литовцы, запорожские казаки, татары. В конце XVIII века произошло массовое переселение на Дон армян и греков. Согласно Всероссийской переписи населения 2010 г. в г. Ростова-на-Дону проживают русские — 89,35 %, армяне — 3,4 %, украинцы — 1,5 %, азербайджанцы — 0,6 %, татары — 0,5 %, белорусы — 0,3 %. Кроме того, большие этнические группы представляют евреи, греки, чеченцы, турки, молдаване, корейцы, удмурты, цыгане и т. д.

Цель исследования. Установить распределение генов HLA II класса у доноров г. Ростова-на-Дону, считающих себя русскими. Провести сравнительный анализ с аналогичными исследованиями в популяциях русских и других народов, проживающих в России и за рубежом.

Материалы и методы. Исследование проводили в государственном бюджетном учреждении Ростовской области «Станция переливания крови» в Зональной лаборатории иммунологического типирования тканей. На оборудовании и расходных материалах, предоставленных нам благотворительным фондом «Русфонд», в 2015 – 2017 гг. было проведено ДНК-типирование 694 доноров крови, давших согласие быть донорами ГСК. Это — случайные, здоровые люди, считающие себя русскими в трех поколениях, в возрасте от 18 до 42 лет. Из них — 358 — мужчины и 336 — женщины.

Геномную ДНК выделяли из венозной крови доноров реагентами «Protrans» (DNA Vox500). Молекулярно-генетическое типирование (базовое разрешение) проводили полимеразной цепной реакцией набором сиквенс-специфических праймеров (PCR-SSP). Детекцию проводили в 2 % агарозном геле с использованием электрофореза. Все исследования выполняли стандартными реактивами фирмы «Protrans» (Германия). Расчет основных иммуногенетических показателей: частоты (gf) 13 специфичностей гена DRB1*

и 5 специфичностей гена DQB1*, частоты (HF) двухлокусных гаплотипов HLA DRB1* – HLA DQB1*, величины неравновесного сцепления (D') был проведен с помощью компьютерной программы Арлекин 3.5. Достоверность различий между группами оценивали с помощью критерия χ^2 . Полученные нами результаты сравнивали с популяциями русских из разных регионов России — Архангельской, Волгоградской, Костромской, Смоленской, Челябинской областей; городов Астрахани, Москвы, Санкт-Петербурга; а также с белорусами, украинцами, армянами, гагаузами (самоопределившиеся жители Молдовы), курдами, калмыками, татарами, казахами, удмуртами.

Результаты. С высокой частотой в ростовской популяции русских встречались аллельные семейства гена HLA-DRB1*11 (0,159), DRB1*15(0,142), DRB1*07 (0,132), DRB1*13 (0,131), DRB1*01 (0,106), DRB1*04 (0,103). С одинаковой частотой, редко встречались аллельные семейства HLA DRB1*09 и DRB1*10 (0,009); DRB1*12 и DRB1*14 (0,017). Частота гена HLA DRB1* у русских г. Ростова оказалась сопоставимой с 8 популяциями русских из разных регионов России. Особенность ростовской популяции — повышенная частота DRB1*11 и несколько сниженная частота DRB1*01 по сравнению с другими популяциями русских. Вероятнее всего, особенности распределения этих специфичностей гена HLA DRB1 связаны с влиянием других больших этнических групп, длительно проживающих на одной территории. Можно предположить, что частота DRB1*11 оказалась повышенной из-за контактов с популяциями, имеющими высокую частоту данной специфичности — украинцев, армян, гагаузов, курдов (0,185; 0,229; 0,240; 0,260 соответственно), имеющих низкую частоту данной специфичности.

У русских доноров г. Ростова наблюдалась высокая частота аллельного семейства HLA DQB1*03 (0,354) и низкая — HLA DQB1*04 (0,027).

Частота этих специфичностей сопоставима с частотой в популяциях Санкт-Петербурга и Челябинской области. Частота DQB1*02 в г. Ростове (0,178) и г. Санкт-Петербурге (0,175) почти одинакова, но достоверно снижена по сравнению с Челябинской областью (0,201; $\chi^2 - 10,76$; $p < 0,05$).

Наиболее характерными для ростовской популяции русских были гаплотипы: DRB1*11 — DQB1*03 (HF - 0,154; D' — 0,96),

DRB1*15 — DQB1*06 (HF — 0,134; D' — 1,0), DRB1*04 — DQB1*03 (HF — 0,097; D' — 0,9). Гаплотип DRB1*11 — DQB1*03 в ростовской популяции встречался несколько чаще (15,4 %), чем в Челябинской области (11,84 %).

Выводы. Можно отметить, что иммуногенетическая структура популяции г. Ростова, состоящая из доноров регистра ГСК, считающих себя русскими, имеет типичный западноевропейский вариант распределения частоты аллельных семейств гена HLA DRB1*,

частоты распределения двухлокусных гаплотипов DRB1*- DQB1*, величины неравновесного сцепления, что характеризует ее как европейскую. Полученные нами данные могут быть использованы для успешного поиска донора для неродственной трансплантации костного мозга и в качестве контрольной группы в научных исследованиях по проблеме «HLA и болезни», в этнологии для изучения генетического родства популяций.

Злотникова М. В., Семёнов Г. В., Карпенко Ф. Н., Расюк Е. Д.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Республика Беларусь

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ОРГАНИЗАЦИЯХ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Введение: В настоящее время трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) является признанным и широко используемым в мире методом терапии целого ряда гематологических, онкологических и наследственных заболеваний. Вероятность найти идентичного по системе HLA сиблинга для пациентов, нуждающихся в трансплантации, составляет около 25 %. В остальных случаях поиск донора трансплантата осуществляется среди неродственной когорты лиц, давших своё согласие на сдачу гемопоэтических стволовых клеток.

Цель исследования. Изучить динамику численности HLA-типированных потенциальных доноров ГСК в организациях службы крови Республики Беларусь.

Материалы и методы. В Республике Беларусь с 2013 года функционирует реестр доноров гемопоэтических стволовых клеток, объединяющий в себе информацию об HLA-фено(гено)типах потенциальных доноров ГСК из 7 баз данных организаций переливания крови. Организовано проведение серологического типирования по I классу в областных станциях переливания крови (ОСПК) на типизирующих панелях производства РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (РНПЦ ТиМБ). Молекулярно-генетическое типирование по II классу осуществляется в РНПЦ ТиМБ по технологии SSO для всех потенциальных доноров ГСК, рекрутированных из донорского контингента крови и её компонентов.

Результаты. К 2014 году в Республике Беларусь сформировалась четкая система рекрутирования потенциальных доноров ГСК в базу данных Центрального реестра. Общее количество HLA-типированных потенциальных доноров ГСК в организациях переливания крови составляет около 34 000, из которых на долю РНПЦ ТиМБ приходится около 50 %. По HLA-ABCDR типировано 18 920 доноров, что составляет более 55 % от общего количества доноров ГСК. Показатель эффективного развития Республиканского реестра находит свое отражение в ежегодном увеличении числа потенциальных доноров ГСК ОПК за последние несколько лет, преимущественно за счёт кадровых и первичных доноров крови. На 2014 год в Центральный реестр были внесены данные о 12 386 рекрутированных потенциальных донорах ГСК. В 2015 году база пополнилась на 5521 донора, в 2016 и 2017 гг. — увеличилась на 7193 и 8602 человека, что позволило провести 8 аллогенных трансплантаций.

Выводы. Динамичное нарастание информационной базы HLA-типированных доноров гемопоэтических стволовых клеток Центрального реестра Республики Беларусь и перспективное объединение с регистрами Российской Федерации и Республики Казахстан повысит вероятность нахождения идентичного донора для трансплантации ГСК.

Иоффе Ю. Г.¹, Шмидт А. Х.², Заутер Ю.², Кипяткова В. А.³, Красильщиков А. М.⁴

¹ Благотворительный фонд «Карельский регистр неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток», г. Петрозаводск,

² DKMS-Tuebingen, г. Тюбинген (Германия),

³ СПб ЭМИ РАН, г. Санкт-Петербург,

⁴ ФТИ им. А. Ф. Иоффе, г. Санкт-Петербург

ВИЧ-РЕЗИСТЕНТНЫЕ ГЕНОТИПЫ В КАРЕЛЬСКОМ РЕГИСТРЕ НЕРОДСТВЕННЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК: КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Введение. В 1996 г. было показано, что гомозиготное носительство делеции 32 гена CCR5 (CCR5 Del32) связано с резистентностью к вирусу ВИЧ. В 2007 г. в берлинской клинике Charite успешно проведена неродственная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) от донора, гомозиготного по CCR5 Del32 пациенту, страдавшему ВИЧ инфекцией и острым миелобластным лейкозом. В результате пациент был излечен одновременно от ВИЧ инфекции и лейкемии. Однако в последующие годы уже не было столь оптимистичных сообщений об успешных неродственных ТГСК от ВИЧ-резистентных доноров пациентам, страдавшим одновременно ВИЧ инфекцией и онкогематологическими заболеваниями. Международная поисковая система доноров костного мозга (BMDW) не аккумулирует в себе данные о ВИЧ-резистентных донорах. Тем не менее, некоторые регистры доноров ГСК и банки пуповинной крови, в частности, Покровский банк пуповинной крови (Санкт-Петербург) и Челябинский регистр доноров костного мозга, тестируют своих доноров на наличие CCR5 Del32, формируя базы данных ВИЧ-резистентных доноров. Помимо CCR5 Del32 с ВИЧ-резистентностью ассоциируются некоторые HLA-генотипы, в частности, группы аллелей В*27, В*57 и гаплотип DRB1*13 – DQB1*06.

С 2015 г. всем первичным и повторным донорам Карельского регистра неродственных доноров ГСК проводится определение гена CCR5 в лаборатории DKMS Life Science Lab (Германия). В этой же лаборатории проводится HLA-типирование доноров высоким разрешением.

Цель. Целью настоящей работы явилась оценка количества ВИЧ-резистентных доноров Карельского регистра и частотностей генотипов, ассоциируемых с ВИЧ-резистентностью: анализ частот CCR5 Del32,

а также частот групп аллелей В*27, В57* и гаплотипа DRB1*13 – DQB1*06.

Материалы и методы. В анализ были включены данные доноров, которым HLA-типирование осуществлено молекулярно-биологическим методом. Оценки частот групп аллелей и гаплотипов получены как напрямую, так и с помощью EM-алгоритма («expectation-maximization», вариант метода максимального правдоподобия). Кроме того, было проверено, что равновесие Харди-Вайнберга для групп аллелей В*27, В57* и гаплотипа DRB1*13 – DQB1*06 соблюдается на уровне лучше 2 стандартных отклонений (95 %).

Результаты. Гомозиготы CCR5 Del32 оказались у 15 доноров из 1468 протипированных по этому гену, что составило 1,0 % +/- 0,26 %. Гетерозиготное носительство CCR5 Del32 / WT выявлено у 288 доноров из 1468 (19,6 % +/- 1,03 %), гомозиготы HLA-B*27 — у 13 из 3656 (0,36 % +/- 0,1 %), гомозиготы HLA-B*57 — у 6 из 3656 (0,16 % +/- 0,07 %). Гетерозиготы, у которых в одной из хромосом имеется HLA-B*27, а в другой HLA-B*57, обнаружены в 12 из 3656 случаев (0,3 % +/- 0,1 %). Также выявлено 14 из 1504 протипированных доноров, гомозиготных по HLA-DRB1*13 и одновременно по HLA-DQB1*06 (0,93 % +/- 0,16 %). Все статистические ошибки указаны на уровне 68 % (1 стандартное отклонение).

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о том, что донорская база Карельского регистра ГСК содержит 9 % ВИЧ-резистентных доноров: 330 человек из 3656 (с учетом 3 совпадений по перечисленным выше признакам) имеют генотипы, ассоциируемые с ВИЧ-резистентностью. Следует надеяться на то, что ВИЧ-резистентные доноры ГСК окажутся востребованными для проведения неродственных ТГСК пациентам, страдающим ВИЧ и онкогематологическими заболеваниями.

Кострома И. И., Жернякова А. А., Чубукина Ж. В., Семенова Н. Ю., Запорева И. М., Тиранова С. А., Бессмельцев С. С., Четкин А. В., Грицаев С. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

ФАКТОРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ОТДЕЛЬНЫХ ЭТАПОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК (АУТОТГСК) У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Введение. АутоТГСК — составляющая часть алгоритма лечения больных множественной миеломой (ММ). Эффективность АутоТГСК опосредована циторедуктивным действием режима кондиционирования. Не менее важным условием является скорость и надежность восстановления кроветворения после высокодозной химиотерапии. В свою очередь, сроки приживления трансплантата зависят от количественных и качественных характеристик, в частности, от объема инфузировавшихся CD34⁺ клеток.

В литературе представлено большое число показателей, сопряженных с вероятностью неудачной мобилизации ГСК из костного мозга в периферическую кровь, а также с длительностью посттрансплантационной аплазии. Внедрение в клиническую практику новых лекарственных препаратов, совершенствование режимов мобилизации и интенсификация схем кондиционирования может оказать негативное влияние на состав продукта афереза и длительность периода посттрансплантационной цитопении.

Цель. Поиск предикторов эффективности АутоТГСК у больных ММ. Для решения поставленной цели были сформулированы 2 задачи. Первая — выявить факторы, ассоциированные с количеством CD34⁺ в аутотрансплантате. Вторая — установить показатели, сопряженные со сроками приживления трансплантата.

Материалы и методы. Для решения первой задачи были проанализированы данные 75 больных с медианой возраста 56 (26 – 67) лет, включая 42 больных миеломой G, 21 больного миеломой A и 8 больных миеломой Бенс-Джонса. Миелома D была верифицирована у одной больной и у 3 больных диагностирован несекретирующий вариант (данные этих больных в анализ влияния варианта ММ на клеточность трансплантата не вошли).

Режим мобилизации, за исключением одного случая, когда был использован грану-

лоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) в режиме монотерапии, состоял из внутривенного введения циклофосфана в дозе 3,0 г/м² (47 больных) или внутривенного введения винорелбина в дозе 35 мг/м² (27 больных) в комбинации с Г-КСФ.

Перед инициацией режима мобилизации были констатированы следующие варианты ответа: полный ответ (ПО) у 20 (26,7 %) больных, очень хороший частичный ответ (ОХЧО) у 23 (30,7 %) и частичный ответ (ЧО) у 32 (42,6 %) больных.

Для решения второй задачи анализу были подвергнуты данные 72 больных, которым в общей сложности было выполнено 112 АутоТГСК: 32 (44,4 %) больным одиночная и 40 (55,6 %) больным двойная, включая тандемную АутоТГСК. Статус болезни перед инициацией режима кондиционирования был следующим: ПО у 54 (48,2 %) больных, ОХЧО у 18 (16,1 %) больных и ЧО у 40 (35,7 %) больных.

Медиана количества трансфузированных CD34⁺ клеток составила 2,65x10⁶/кг веса тела и находилась в диапазоне от 0,77 до 10,45x10⁶/кг веса тела. Ни в одном случае заготовки аутотрансплантата в состав режима мобилизации плериксафор не входил. Всем больным в посттрансплантационном периоде назначался Г-КСФ.

Результаты. При анализе результатов заготовки аутотрансплантата установлена корреляционная связь количества CD34⁺ клеток со следующими показателями: с числом схем, которые назначались больным в период, предшествующий проведению аферезов: 1 схема против ≥2 схем, $r = -0,278$, $p < 0,05$; с режимом мобилизации: циклофосфан против винорелбина, $r = 0,320$, $p < 0,05$; с качеством ответа: ПО против других вариантов, $r = 0,262$, $p < 0,05$. Возраст, вариант ММ и предшествующий прием леналидомида прогностического значения не имели.

Анализ сроков приживления трансплантата выявил корреляционную связь длительно-

сти периода восстановления кроветворения с порядковым номером АутоТГСК; $r = -0,025$; $p < 0,05$. Данная находка сопряжена с тем фактом, что при проведении повторной АутоТГСК значимо чаще использовался режим кондиционирования «Mel140»: в 53,2 % случаев против 17,5 % при выполнении первой АутоТГСК; $p = 0,001$. Наблюдаемое при этом снижение миелоаблативного воздействия на костномозговое кроветворение способствовало укорочению периода агранулоцитоза: 9 дней и 10 дней при повторной и первой АутоТГСК соответственно; $p = 0,001$. Другим фактором, который влияет на сроки восстановления АЧН и тромбоцитов, является количество трансфузированных CD34⁺ клеток; $r = -0,296$, $p < 0,05$ и $r = -0,412$, $p < 0,05$ соответственно.

Выводы. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что качество аутотрансплантата и, соответственно сроки восстановления гемопоэза после АутоТГСК, во многом определяются эффективностью терапии в предтрансплантационном периоде. Корректный выбор индукционной схемы, способствующий достижению ответа в максимально короткие сроки, и выбор интенсивности режима мобилизации, адаптированного к характеру предшествующей терапии, возрасту больного, интенсивности режима кондиционирования и числу предполагаемых АутоТГСК, могут обеспечить максимальное быстрое приживление трансплантата после АутоТГСК.

**Котова А. В., Скакун В. Н., Клементьева Н. А.,
Золина Т. Л., Елсукова Л. В., Енукашвили Н. И.**

ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, ООО «Медико-биологический центр», Великий Новгород

STR-ПРОФИЛИРОВАНИЕ — НЕОТЪЕМЛЕМЫЙ ЭТАП КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРИ БАНКИРОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Введение. Аутентификация клеточных культур — одна из важнейших задач контроля качества при создании банка клеток и биологических образцов. Банкирование клеток требует абсолютной уверенности в отсутствии перекрестного заражения другими образцами, а при производстве аутологичных клеточных продуктов важно удостовериться, что клетки, используемые для их изготовления, принадлежат пациенту, поскольку это является вопросом его безопасности. В соответствии с Федеральным законом «О биомедицинских клеточных продуктах» ФЗ-180, в Российской Федерации формируется обращение биомедицинских клеточных продуктов, что повышает требования к обеспечению и контролю качества, и, следовательно, становится необходимым использование надежного метода идентификации клеточных культур и биологических образцов при банкировании.

Материал и методы. Анализ полиморфизма STR (Short tandem repeat) — это стандартный метод идентификации клеток, позволяющий исследовать высокополиморфные

участки (генетические локусы) ДНК, строго специфичные для каждой клеточной культуры. Этот метод широко применяется в международных банках клеточных культур. Американский национальный институт стандартов (ANSI) и Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC) создали стандарт профилирования (ASN-0002) для клеточных линий человека, основанный на использовании коротких tandemных повторов (STR), согласно которому для идентификации культуры необходимо исследовать 17 маркеров STR и локус амелогенина.

Результаты. С 2017 года в Покровском банке каждая клеточная культура мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученная из периваскулярного пространства пупочной вены человека, идентифицируется методом STR-профилирования, и результат такого исследования оформляется в виде отдельного паспорта. При поступлении пупочного канатика в лабораторию, осуществляют отбор образца ткани для генетического анализа коротких tandemных повторов и создания

референтного профиля. Анализ проводится в лаборатории ООО «Медико-биологический центр» с использованием набора «COrDIS Plus» для идентификации 19 маркеров STR и локуса амелогенина человека. Анализ включает 13 классических систем комбинированного индекса ДНК-CODIS (D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA), 5-ENFCI (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045), а также SE33 и амелогенин. Перед криоконсервацией клетки отбираются для повторного STR-профилирования и сравнения референтного профиля и профиля после культивирования, что обеспечивает контроль перекрестной контаминации. На настоящий момент проанализирован 261 образец. Применение подобного метода позволило быстро и эффективно идентифицировать образцы. Этот метод оказался крайне полезен в ряде сложных случаев идентификации биологического материала. Например, при заборе пупочного канатика от двойни в родильном доме были перепутаны сопроводительные документы, что выяснилось толь-

ко после проведения STR-профилирования, так как дети были разного пола. Культуры, предназначенные для именованного хранения, можно подвергнуть повторной аутентификации по запросу пациента. Определить принадлежность клеток возможно в случае полной утраты любых идентификационных знаков в процессе хранения (например, при утрате штрих кодов или стирании надписей на пробирке). С помощью STR-профилирования также можно выявить наличие спонтанных мутаций и перестроек в геноме клеточной культуры, что является критичным для безопасности и контроля качества. Для всех исследованных культур не показано изменений в геноме.

Выводы. Применение STR-профилирования позволяет на любом этапе обработки и заготовки клеточного продукта и биологического образца проверить его биологическую принадлежность, что обеспечивает качество и безопасность биологических образцов, делая их пригодными для производства биомедицинских продуктов в дальнейшем.

Кузьмина Е. П., Хамаганова Е. Г., Абдрахимова А. Р.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЬНЫХ ГРУПП И ГАПЛОТИПОВ HLA В ПОПУЛЯЦИИ ОСЕТИН ВЛАДИКАВКАЗА

Введение. Регистр потенциальных доноров костного мозга ФГБУ «НМИЦ гематологии» г. Москва в своем большинстве представлен донорами, проживающими в Москве и Московской области и самоопределившимися, как русские. Однако в состав регистра входят также представители других этнических групп и регионов проживания, в частности осетины Владикавказа. Осетины являются носителями осетинского языка, который принадлежит к иранской группе индоевропейских языков, и предположительно являются потомками Алан — племени скифосарматского происхождения. Генетические исследования осетин (митохондриальной ДНК и Y-гаплогрупп) выявили большее их сходство с русскими, чем с соседями — другими популяциями Кавказа. Исходя из всего вышесказанного, оценка иммуногенетического

профиля осетин по генам HLA представляется особенно интересной.

Целью данной работы было оценить частоты встречаемости аллельных групп и гаплотипов HLA у осетин Владикавказа.

Материалы и методы. Исследуемая выборка представлена 127 здоровыми донорами, которые проживают в г. Владикавказ Северной Осетии и являются осетинами в третьем поколении. Материал для исследования — венозная кровь. Выделение ДНК — Blood DNA Extraction Kit на приборе NorDiag Arrow (NorDiag, Норвегия). Типирование по 6 локусам генов HLA проводили методом PCR-SSO на платформе Luminex с использованием наборов Lifecodes SSO Typing Kit (Immucor, США), для уточнения неоднозначностей пользовались наборами Olerup (Швеция). 127 доноров типированы по локусам HLA-A,—

B,—C,—DRB1,—DQB1, из них 119 доноров дополнительно типированы по локусу -DQA1. Статистическую обработку данных и соответствие наблюдаемого распределения аллельных групп равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием программы Arlequin 3.5.

Результаты. Согласно закону Харди-Вайнберга исследуемая выборка находится в состоянии равновесия по всем локусам. В результате типирования осетин по генам HLA I класса было выявлено 14 аллельных групп в локусе A, 20 аллельных групп в локусе B и 13 аллельных групп в локусе C. Наиболее распространенными вариантами в локусе HLA-A оказались A*02 (24.8%), A*30 (13.4%) и A*03 (12.6%). В локусе HLA-B — B*49 (15.7%), B*51 (12.6%), B*07 (11%). Среди аллельных групп локуса HLA-C высокие частоты наблюдались для C*07 (41.3%), C*06 (15.3%), C*04 (8.3%) и C*12 (8.3%).

При типировании осетинской популяции по генам HLA II класса было выявлено 12 аллельных групп в локусе HLA-DRB1, 6 аллельных групп в локусе HLA-DQA1 и 5 аллельных групп в локусе HLA-DQB1. Самыми высокочастотными в локусе HLA-DRB1 аллельными группами оказались DRB1*13 (21.7%), DRB1*11 (17.3%), DRB1*15 (13%).

В локусах HLA-DQA1 и HLA-DQB1 наиболее частотными были DQA1*01 (47%), DQA1*05 (31%), DQA1*02 (11%), DQB1*06 (34.2%), DQB1*03 (30.2%), DQB1*02 (23.6%).

При оценке шестилокусных гаплотипов в популяции осетин (2n=238) наиболее частым оказался гаплотип A*30-B*49-C*07-DRB1*13-DQA1*01-DQB1*06 (9%). Данный гаплотип с подобной частотой не встречается ни в одной доступной для сравнения попу-

ляции, однако с меньшей частотой есть у турок (0.02%), итальянцев (0.13%) и жителей Никарагуа (0.22%). Следующие гаплотипы, выявленные в популяции осетин: A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQA1*01-DQB1*06 (встретился с частотой 4.6%) и A*32-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (с частотой 2.5%) довольно распространены в европейских популяциях и среди русских доноров регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии»; и гаплотип A*02-B*51-C*16-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 с частотой 3.7% — характерен прежде всего для представителей азиатских популяций. Гаплотип, который преобладает в большинстве европейских популяций и у русских доноров регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» — A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02, у осетин занимает пятое по частоте место и встречается в 1.7% случаев.

Выводы. Таким образом, осетины Владикавказа представляют собой популяцию, уникальность которой заключается в одновременном присутствии у них с высокой частотой таких аллельных групп, как HLA-A*02 и A*30, HLA-B*51 и B*07, а также гаплотипов A*03-B*07-C*07-DRB1*15-DQA1*01-DQB1*06 и A*02-B*51-C*16-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03, характерных для европейцев и для азиатов. Кроме того, отличительной чертой осетин, выделяющей их среди мировых и основных российских популяций, можно считать высокие частоты аллельных групп HLA-B*49, HLA-C*07, HLA-DRB1*13 и гаплотипа A*30-B*49-C*07-DRB1*13-DQA1*01-DQB1*06. Типирование и включение в регистр доноров с подобными генотипами повысит вероятность нахождения совместимых неродственных доноров для пациентов из того же региона и пациентов с редкими генотипами HLA.

**Кузьмич Е. В., Алянский А. Л., Ермолина В. В., Мерзлякова С. В.,
Тяпушкина С. С., Насрединова А. А., Иванова Н. Е., Зубаровская Л. С., Афанасьев Б. В.**

*НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова
Минздрава России, Санкт-Петербург*

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ HLA~A*~B*~C*~DRB1*~DQB1* ГАПЛОТИПОВ В РЕГИСТРЕ ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА ПСПбГМУ им. И. П. ПАВЛОВА. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕГО HLA ТИПИРОВАНИЯ

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) является ведущим методом терапии

злокачественных заболеваний системы крови. К числу факторов, оказывающих существенное влияние на результаты алло-ТГСК,

относятся совместимость пары донор/реципиент по HLA аллелям, HLA гаплотипам. Развитие сети регистров потенциальных доноров костного мозга на территории Российской Федерации повышает доступность неродственных доноров с оптимальными иммуногенетическими характеристиками для российских пациентов, которым необходимо проведение алло-ТГСК.

Цель исследования. Изучить распределение пятилокусных HLA-A*~B*~C*~DRB1*~DQB1* гаплотипов в регистре доноров костного мозга Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова.

Материалы и методы. Обследованная когорта включала 1000 доноров. Высокоразрешающее HLA типирование выполнено с помощью метода моноаллельного секвенирования по Сэнгеру с использованием реагентов фирмы Protrans (Германия), программного обеспечения для анализа HLA аллелей Sequence Pilot version 4.1.2. Определение частот HLA гаплотипов осуществлено на основе алгоритма максимизации ожидания (EM алгоритм) с помощью программы Arlequin version 3.5.1.2.

Результаты. В обследованной когорте выявлено 1325 HLA~A*~B*~C*~DRB1*~DQB1* гаплотипов из 27125 потенциально возможных. Определены гаплотипы, которые встречаются у доноров регистра с максимальной частотой:

1. A*01:01~B*08:01~C*07:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01 – 3,36 %
2. A*03:01~B*07:02~C*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02 – 3,12 %
3. A*03:01~B*35:01~C*04:01~DRB1*01:01~DQB1*05:01 – 1,81 %
4. A*02:01~B*07:02~C*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02 – 1,34 %
5. A*25:01~B*18:01~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*06:02 – 1,03 %

6. A*02:01~B*13:02~C*06:02~DRB1*07:01~DQB1*02:01 – 1,01 %
7. A*24:02~B*07:02~C*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02 – 0,83 %

Выполнен сравнительный анализ результатов исследования с данными, опубликованными регистром NMPD, США (<http://www.allelefreqencies.net>). Наиболее распространенные в нашем регистре A*01:01~B*08:01~C*07:01~DRB1*03:01~DQB1*02:01, A*03:01~B*07:02~C*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02, A*02:01~B*07:02~C*07:02~DRB1*15:01~DQB1*06:02 гаплотипы встречаются с высокой частотой в когорте доноров европейского происхождения NMDP (6,53 %, 3,11 % и 1,97 % соответственно). Гаплотип A*03:01~B*35:01~C*04:01~DRB1*01:01~DQB1*05:01 встречается в когорте доноров NMDP с несколько более низкой частотой (1,12 %). Информация об идентификации A*02:01~B*13:02~C*06:02~DRB1*07:01~DQB1*02:01, A*25:01~B*18:01~C*12:03~DRB1*15:01~DQB1*06:02 гаплотипов у доноров европейского происхождения NMDP не представлена.

К числу гаплотипов, принадлежащих к группе высокочастотных по данным NMDP, относятся A*02:01~B*44:02~C*05:01~DRB1*04:01~DQB1*03:01, A*29:02~B*44:03~C*16:01~DRB1*07:01~DQB1*02:01 (частота 1,85 % и 1,57 %). В нашем регистре данные гаплотипы встречаются с частотой 0,20 % и 0,35 % соответственно. Таким образом, результаты анализа демонстрируют, что распределение HLA гаплотипов в группах сравнения имеет характерные особенности.

Выводы. Выполнен анализ распределения HLA гаплотипов в регистре доноров костного мозга ПСПБГМУ им. акад. И. П. Павлова. Результаты исследования могут быть использованы для оценки вероятности подбора оптимального донора в российских или международных регистрах российским пациентам, которым показано проведение алло-ТГСК.

**Кузьмич Е. В., Алянский А. Л., Ермолина В. В., Мерзлякова С. В.,
Тяпушкина С. С., Насрединова А. А., Иванова Н. Е., Зубаровская Л. С., Афанасьев Б. В.**

*НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова
Минздрава России, Санкт-Петербург*

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫСОКОРАЗРЕШАЮЩЕГО HLA ТИПИРОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ РЕГИСТРА ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА ПСПбГМУ им. И. П. ПАВЛОВА

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного донора является вариантом выбора для пациентов, не имеющих HLA идентичного родственного донора. Скорость и успешность поиска неродственного донора для конкретного больного зависит от ряда факторов. Среди них — наличие у пациента распространенного или редкого HLA гаплотипа, редких вариантов HLA аллелей, а также количество и уровень иммуногенетического обследования потенциально совместимых доноров.

Цель исследования. Изучить распределение частот HLA-A, — B, — C, — DRB1, — DQB1 аллелей, установленных с помощью HLA типирования высокого уровня разрешения, в регистре доноров костного мозга ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

Материалы и методы. Выполнено иммуногенетическое обследование 1000 потенциальных доноров. Высокоразрешающее HLA типирование осуществлено с помощью метода моноаллельного секвенирования по Сэнгеру с применением реагентов фирмы Protrans (Германия), программного обеспечения Sequence Pilot version 4.1.2. Определение частот HLA аллелей выполнено с помощью программы Arlequin version 3.5. 1.2.

Результаты. Анализ результатов высоко-разрешающего HLA типирования 1000 потенциальных доноров позволил идентифицировать три новых HLA аллеля, выявить присутствие редких HLA аллелей, определить наиболее распространенные HLA аллели в регистре ПСПбГМУ им. И. П. Павлова. Новые аллели, официально названные *B*44:02:45*, *DQB1*02:85*, *DRB1*01:01:30*, зарегистриро-

ваны Номенклатурным Комитетом по факторам HLA системы Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) (Marsh S. G. E., 2017). Аллели *HLA-A*02:460*, *HLA-A*31:66*, *HLA-B*08:138*, обнаруженные у доноров регистра, согласно информации AFND (Allele Frequency Net Database) относятся к группе редких (<http://www.allelefreqencies.net>).

Установлено, что у потенциальных доноров регистра ПСПбГМУ им. И. П. Павлова наиболее распространенными аллелями локуса HLA-A являются: *A*02:01* – 23,9 %, *A*03:01* – 13,9 %, *A*01:01* – 10,9 %, *A*24:02* – 10,2 %, *A*11:01* – 4,6 %, *A*25:01* – 4,2 %. В локусе HLA-B наиболее часто встречаются: *B*07:02* – 11,6 %, *B*08:01* – 6,7 %, *B*18:01* – 5,1 %, *B*13:02* – 4,9 %, *B*35:01* – 4,9 %, *B*44:02* – 4,7 %. В локусе HLA-C с максимальной частотой представлены аллели: *C*07:02* – 13,1 %, *C*07:01* – 10,7 %, *C*04:01* – 9,3 %, *C*06:02* – 9,0 %, *C*12:03* – 8,9 %, *C*02:02* – 5,5 %. Наиболее высокочастотными аллелями локуса HLA-DRB1 являются: *DRB1**07:01* – 13,2 %, *DRB1*15:01* – 11,5 %, *DRB1*01:01* – 10,2 %, *DRB1*03:01* – 8,2 %, *DRB1*13:01* – 5,2 %, *DRB1*16:01* – 4,4 %. В локусе HLA-DQB1 наиболее часто определяются аллели: *DQB1*03:01* – 14,6 %, *DQB1*02:01* – 13,9 %, *DQB1*05:01* – 11,5 %, *DQB1*06:02* – 10,7 %, *DQB1*03:02* – 6,3 %, *DQB1*06:03* – 5,8 %.

Выводы. Применение методов высоко-разрешающего HLA типирования для иммуногенетического обследования потенциальных доноров регистра будет способствовать сокращению времени поиска неродственного донора для проведения алло-ТГСК, а также изучению полиморфизма генов системы HLA.

Кутявина С. С., Смирнова Д. Н., Черанев В. В., Логинова М. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства, Киров

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОДБОРА СОВМЕСТИМЫХ ДОНОРОВ ДЛЯ ПАЦИЕНТОВ, НУЖДАЮЩИХСЯ В ТГСК

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является одним из наиболее эффективных методов лечения ряда гематологических, онкологических и наследственных заболеваний. Ежегодно в мире проводится около 50 – 60 тысяч ТГСК от совместимого родственного, неродственного или гаплоидентичного донора. Одним из важнейших условий успешного проведения ТГСК является подбор донора, совместимого по генам HLA-системы (*Human Leukocyte Antigens* — человеческие лейкоцитарные антигены).

Гены HLA-системы, определяемые в процессе проведения тканевого типирования, очень полиморфны и имеют высокую степень вариабельности. По состоянию на декабрь 2017 года зарегистрировано 17 695 аллелей HLA (I класс — 12893 аллеля, II класс — 4802 аллеля). Это приводит к большому генетическому разнообразию, существенно осложняющему подбор совместимого донора.

Цель работы. Проведение анализа эффективности подбора совместимых доноров для пациентов, нуждающихся в ТГСК.

Материалы и методы. Проведен ретроспективный анализ результатов подбора совместимых родственников, неродственных, гаплоидентичных доноров для 109 пациентов института, нуждающихся в ТГСК (55 — женщины, 54 — мужчины). По диагнозам пациенты распределялись следующим образом: миелолейкоз — 47 (43,1%), лимфобластный лейкоз — 24 (22,0%), апластическая анемия — 11 (10,1%), лимфомы — 11 (10,1%), другие — 16 (14,7%).

Подбор HLA-совместимых доноров осуществляли по 5 локусам — HLA-A, — B, — C, — DRB1, — DQB1. HLA-типирование пациентов и доноров проведено молекулярно-генетическими методами — SSP и SBT.

При подборе донора использовали следующую стратегию: после получения результата высокоразрешающего типирования пациента производили сбор данных о наличии потенциальных родственников доноров.

В случае наличия сиблингов проводили HLA-типирование локусов II класса в низком разрешении. При выявлении несовместимости исследование прекращали, при выявлении совместимости — типировали локусы I класса в низком разрешении. При полной совместимости пары донор-реципиент на уровне низкого разрешения осуществляют высокоразрешающее типирование донора.

Подбор потенциальных неродственных доноров в объединенной базе данных о российских донорах BMDS проводили для каждого пациента.

При отсутствии совместимых родственников и неродственных доноров и наличии врачебного заключения о возможности проведения гаплотрансплантации производили типирование родителя/ребенка в низком разрешении. При выявлении гаплосовместимости (не менее чем 5/10) пары донор-реципиент проводили высокоразрешающее HLA-типирование.

Результаты. В ходе анализа данных установлено, что 37,6% (41) пациентов имеют одного или нескольких сиблингов. В ходе подбора потенциального родственного донора протипировано 48 сиблингов: для 21 донора исследование прекращалось на этапе изучения локусов II класса, 5 доноров оказались несовместимыми с пациентами после получения результатов типирования в низком разрешении по всем пяти локусам, 1 донор оказался частично совместим (9/10), 21 донор был полностью совместим с пациентом (10/10).

На основании врачебного заключения гаплоидентичная ТГСК показана 14 пациентам (12,8%), для которых были протипированы 17 родственников доноров (родителей/детей), все из которых оказались гаплосовместимыми.

Для остальных 74 пациентов требовался поиск потенциального неродственного донора. В объединенной базе данных о российских донорах BMDS были найдены полностью совместимые неродственные доноры для 29

(39,2 %) пациентов (при этом для 10 число совместимых доноров было более чем 2), для 23 (31,1 %) — частично совместимые (9/10), для 22 пациентов (29,8 %) — потенциальный неродственный донор не был найден. Это подчеркивает важность увеличения числа потенциальных неродственных доноров в России.

Выводы. Установлено, что только 19,3 % пациентов имеют совместимого родственного донора. Для 39,2 % пациентов, не имеющих родственных доноров, удалось подобрать совместимого неродственного донора. 20 % пациентов не имеют совместимых доноров.

Лексина Я. А., Габидуллина Р. И., Ананьева А. В., Шагимарданова Е. И.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (приволжский) федеральный университет», Казань

ОПЫТ ВНЕДРЕНИЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ (NGS) ДЛЯ HLA-ТИПИРОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА В РФ

Введение. С момента появления метода секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing — NGS) наблюдается его быстрое внедрение в научные и клинические молекулярно-генетические лаборатории. Преимущество метода по сравнению с другими технологиями типирования связано с относительно небольшой стоимостью, меньшей трудозатратностью, скоростью обработки большого количества образцов. В первую очередь, метод стал востребованным для поиска патогенных вариантов (мутаций), ассоциированных с различными генетическими заболеваниями. В последние годы наблюдается все более широкое внедрение метода NGS для типирования генов гистосовместимости во всем мире. Этот метод дает возможность разрешать аллельные неоднозначности и обеспечивает наивысшую степень разрешения. Успешному внедрению данного метода в рутинную практику иммуногенетических лабораторий способствует и появление на рынке множества компаний, предоставляющих реагенты для пробоподготовки и автоматизированное программное обеспечение для высокоточного определения фенотипа каждого образца.

Цель. Целью данного исследования явилось внедрение метода NGS для HLA-типирования потенциальных доноров костного мозга на платформе Illumina в лабораторию Казанского федерального университета.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали образцы венозной крови потенциальных доноров костного мозга, рекрутированных в рамках выполнения гранта Президента РФ Благотворитель-

ному фонду «Русфонд» (№ 17 – 2 – 004129). Тотальная ДНК выделялась из 200 мкл крови с использованием автоматизированной станции MagNA Pure LS2.0 (Roche Life Science). Концентрация и качество выделенной ДНК оценивалась с помощью спектрофотометра Implen NanoPhotometer NP 80 (Implen). Для дальнейшей подготовки библиотек были использованы наборы двух производителей: NGSgo (GenDX, Нидерланды) и Holotype (Omixon, Венгрия). Секвенирование проводили с использованием MiSeq reagent kit v.2 и секвенатора MiSeq (Illumina, США). Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения, предоставляемого производителями наборов для подготовки библиотек: NGSengine и HLA Twin.

Результаты. Протокол подготовки библиотек для секвенирования двух производителей достаточно схож и включает в себя локус-специфичную ПЦР, фрагментацию ампликонов, лигирование адаптеров (необходимых для связывания с ячейкой и введения сайта для сиквенсового праймера) и индексов (необходимых для введения штрих-кода каждого образца), секвенирование и анализ данных. Подготовка библиотек для секвенирования в формате 96-луночного планшета занимала 2 рабочих дня. При работе двух лаборантов за два дня удавалось получить два пула, содержащих по 96 образцов. Эти образцы смешивались так, что за один запуск секвенатора было возможно протипировать 192 образца одновременно. Результаты секвенирования получали на третьи сутки после запуска, дальнейший анализ занимал от 12 до 24 часов в зависимости от использован-

ного программного обеспечения и мощности компьютера. Каждый образец, вне зависимости от протокола подготовки, был проанализирован с использованием двух программных обеспечений. Как правило, результаты анализа полностью совпадали.

Выводы. При условии работы двух лаборантов в 96-луночном формате с использо-

ванием метода NGS возможно типировать до 192 образцов в неделю. Оба протокола позволяют получить достоверные результаты в высоком разрешении. Таким образом, метод NGS является достаточно производительным и позволяет организовать большое количество типирований для пополнения регистров потенциальных доноров костного мозга.

**Логинова М. А.¹, Павлов А. Е.², Зайцева М. А.²,
Симакова Т. С.², Пильщикова Н. С.², Парамонов И. В.¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства, Киров

² ООО «ПАРСЕК ЛАБ», Санкт-Петербург

ОТЕЧЕСТВЕННАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО HLA- ГЕНОТИПИРОВАНИЯ: РАЗРАБОТКА И ВЕРИФИКАЦИЯ

Введение. По состоянию на 28 февраля 2018 года число потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), зарегистрированных в объединенной базе данных о российских донорах BMDS, составляет 79 595 человек, в неё включены 15 регистров из 11 регионов Российской Федерации. Такое количество безвозмездных доноров на сегодняшний день обеспечило 202 трансплантации ГСК для пациентов российских клиник.

В последние пять лет наметился явный прогресс во взаимодействии трансплантационных клиник с BMDS, однако многие российские пациенты по-прежнему зависят от материала, получаемого из-за рубежа, либо вообще остаются без совместимого неродственного донора.

Сложившаяся ситуация требует увеличения числа потенциальных доноров ГСК в короткие сроки, а требования трансплантационных центров определяют необходимость HLA-типирования доноров молекулярно-генетическими методами как минимум по пяти HLA-локусам. Прогресс в расширении донорской базы ограничивается прежде всего высокой стоимостью реагентов, используемых для проведения массового HLA-типирования доноров и низкой процессивностью анализа. Разработка и внедрение отечественного продукта с высокими технико-экономическими показателями представляется крайне актуальной задачей.

Цель работы. Разработка и верификация тест-системы для высокопроизводительного

HLA-типирования локусов HLA-A,— B,— C,— DRB1,— DQB1 в разрешении 4-digit.

Материалы и методы. Протокол пробоподготовки включал следующие этапы: таргетная амплификация регионов 5 HLA локусов методом Long-Range PCR, ферментативное фрагментирование продуктов ПЦР, лигирование адаптеров, молекулярное баркодирование. Секвенирование ДНК библиотек проводилось с использованием оборудования Illumina MiSeq System. Анализ данных выполняли с использованием 3 алгоритмов, многоуровневой оценкой качества и последующим объединением результатов согласно разработанным правилам. Идентификация HLA аллелей осуществлялась с использованием базы данных IMGT/HLA (версия 3.28.0).

Верификацию тест-системы осуществляли на контрольной выборке из 93 образцов ДНК с установленными генотипами по локусам HLA-A,— B,— C,— DRB1,— DQB1 с использованием наборов реагентов HLAAssure SE SBT Kit и программного обеспечения AssuType. Верификация осуществлялась с применением специально разработанного программного пакета и позволила выполнить оценку свойств тест-системы по долям совпадающих и неоднозначных аллелей. На основании полученных результатов верификации были рассчитаны аналитические свойства тест-системы.

Результаты. Высокоспецифичные праймеры позволяют покрывать весь ген для локусов HLA-A,— B и -C (за исключением части 3'-

UTR), 5'-UTR, 1–4 экзоны для локуса DQB1, 2–4 экзоны для локуса DRB1.

Вся процедура пробоподготовки может быть выполнена одновременно для 96 образцов и занимает 2,5 рабочих дня. После измерения концентрации и пулирования баркодированных библиотек, образец загружается в секвенатор для проведения парноконцевого секвенирования продолжительностью 24 часа.

Анализ данных проводится полностью в автоматизированном режиме. Для 96 образцов общая продолжительность биоинформатической обработки — до 6 часов.

Таким образом, общая производительность системы позволяет провести генотипирование 5 HLA-локусов в высоком разрешении для 10 000 образцов в год силами 2–3 человек.

В ходе верификации были определены чувствительность и специфичность тест-

системы по каждому из HLA-локусов — для A, B они составили 1.0 и 1.0 соответственно, для локуса C — 1.0 и 0.99, для локуса DRB1 — 0.98 и 0.99, для локуса DQB1 — 0.98 и 0.93.

Создан комплект технологической документации для организации производства разработанной тест-системы на территории Российской Федерации.

Выводы.

1. Разработана тест-система для проведения высокопроизводительного HLA-типирования локусов HLA-A, — B, — C, — DRB1, — DQB1 с разрешением 4-digit.
2. Тест-система верифицирована на выборке из 93 образцов, определены аналитические характеристики.
3. Созданы условия для организации производства и внедрения в практику отечественной тест-системы для высокопроизводительного HLA-типирования.

*Назарова Е. Л., Минаева Н. В., Зорина Н. А.,
Хоробрых М. Н., Сухорукова Э. Е., Шардаков В. И., Парамонов И. В.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», Киров

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Введение. Успехи, достигнутые в лечении множественной миеломы (ММ) в последние годы, связаны с использованием высокодозных режимов терапии с последующей трансплантацией аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК). Это увеличило как общую (ОВ), так и безрецидивную выживаемость пациентов с ММ, а также улучшило качество их жизни. В большинстве случаев в раннем посттрансплантационном периоде наблюдаются токсические и инфекционные осложнения различной степени тяжести, зачастую негативно влияющие на показатели выживаемости и требующие ресурсоемкой сопроводительной терапии.

Цель. Оценить влияние полиморфизма генов иммунного ответа на результат индукционной терапии и особенности течения посттрансплантационного периода у больных ММ после высокодозного лечения и аутоТГСК.

Материалы и методы. Исследования проведены у 20 больных ММ: 8 мужчин и 12 женщин с медианой возраста 51,5 г. (диапазон 32–67 лет), которым выполнена аутоТГСК после режима кондиционирования с использованием высоких доз мелфалана (200 мг/м²). В постиндукционном периоде у 7 больных отмечена частичная ремиссия (ЧР), у 9 — очень хорошая частичная ремиссия (ОХЧР) и у 4 — полный ответ (ПО). У половины пациентов (n=10) после ауто-ТГСК выявлено раннее восстановление (в пределах первых 13 суток; 11–13 суток) числа лейкоцитов ≥ 1000 клеток/мкл. У остальных период агранулоцитоза занимал свыше двух недель (≥ 14 суток; 14–19 суток). Независимо от продолжительности периода нейтропении, у всех больных после ауто-ТГСК отмечалось развитие мукозитов различной степени тяжести. Степень их выраженности оценивали на основании критериев СТСАЕ, 2009. У 7 больных поражение

слизистых оболочек соответствовало 0-I степеням, у 13 — II — III степеням токсичности. В периоде агранулоцитоза у 11 из 20 пациентов наблюдались клинически и микробиологически подтвержденные инфекционные осложнения. Из них, в 5 случаях — бактериальные стоматиты, эзофагиты, энтеропатии (*E. faecium*, *E. faecalis*, *S. viridans* *P. aeruginosa*); в 4 — вирусные пневмонии, гепатиты, поражения кожи и слизистых оболочек (*CMV*, *HBV*, *HCV*, *H. simplex*, *H. zoster*). У 2 пациентов установлен инвазивный аспергиллез легких (КТ-признаки, галактоманнан *Aspergillus*+). Генотипирование 21 полиморфного участка 15 генов иммунного ответа (*TLR2* (Arg753Gln); *TLR3* (Phe421Ile); *TLR4* (Asp299Gln), (Thr399Ile); *TLR6* (Ser249Pro); *TLR9* (T-1237C), (A2848G); *IL1β* (T-31C), (T-511C), (G-1473C), (C-3953T); *IL2* (T-330G); *IL4* (C-589T); *IL6* (C-174G); *IL10* (C-819), (G-1082A); *IL17A* (G-197A); *CD14* (C-159T); *TNFα* (G-308A); *FCGR2A* (His166Arg); *TGF* (G-915C)) проводили методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами до начала режима кондиционирования. Статистический анализ осуществляли методами вариационной статистики с уровнем достоверной значимости результатов $p < 0,05$.

Результаты. Группа пациентов с ОХЧР отличалась от группы больных с ПО после проведения индукционной терапии отсутствием мутантных гомозигот гена *IL10* - 1082 ($p=0,02$), а от группы с ЧР — мутантных гомо-

зигот гена *TLR6* ($p=0,03$). Более длительный период нейтропении после аутоТГСК ассоциирован с наличием в генотипе в гомозиготном состоянии аллеля дикого типа гена *IL17A* ($p=0,03$) и с преобладанием в гетерозиготном состоянии мутантного аллеля гена *IL1β*-31 ($p=0,04$). Группу пациентов с мукозитом II — III степеней от группы больных с мукозитом более легких степеней тяжести (0 — I) отличало полное отсутствие мутантных гомозигот гена *IL1β*-1473 ($p=0,01$) и меньшее число носителей гетеро- и гомозиготных гаплотипов с мутантным аллелем гена *IL10* - 819 ($p=0,01$). Осложнения бактериальной этиологии (в сравнении с вирусными инфекциями) коррелировали с наличием гомозигот дикого типа гена *IL1β*-1473 ($p=0,03$) и мутантных гомозигот гена *IL17A* ($p=0,03$). Обследованных с инвазивным аспергиллезом легких от пациентов с вирусными осложнениями отличало полное отсутствие носительства аллеля дикого типа в гомозиготном состоянии гена *TNF* ($p=0,01$).

Выводы. Полученные нами данные указывают на вклад генов иммунного ответа в формирование полноты ответа на индукционную терапию, скорость восстановления гемопоэза, тяжесть течения мукозитов и в реализацию противоинфекционного иммунитета у больных ММ после аутоТГСК, что позволяет формировать персонализированную тактику их ведения.

Полякова А. П., Белянская Ю. В., Волкова О. Я.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

ПРИМЕНЕНИЕ НАБОРОВ ALLELESEQ (GENDX, НИДЕРЛАНДЫ) ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОВ HLA НА СЕКВЕНАТОРЕ «НАНОФОР-05» (РОССИЯ)

Введение. Секвенирование генов HLA (Human Leucocyte Antigens) является необходимым условием подбора совместимого донора для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Секвенирование по методу Сэнгера до сих пор остается «золотым стандартом» высокоразрешающего типирования генов HLA. Существуют две разновидности этого метода, отличающиеся между собой первым этапом амплификации иско-

мого участка геномной ДНК: моноаллельное и биаллельное секвенирование.

Генетический анализатор «Нанофор-05», разработанный в Институте аналитического приборостроения Российской академии наук (ИАП РАН, Россия), является первым отечественным прибором для секвенирования ДНК по методу Сэнгера. По своим техническим характеристикам он аналогичен анализатору ABI3500 (Applied Biosystems, США),

который широко применяется в клинической практике для секвенирования генов HLA.

Целью настоящего исследования была оценка возможности использования наборов реагентов AlleleSEQR (GenDX, Нидерланды) для секвенирования генов HLA на платформе генетического анализатора «Нанофор-05» (ИАП РАН, Россия).

Материалы и методы. Валидация методики секвенирования на генетическом анализаторе «Нанофор-05» с использованием наборов реагентов AlleleSEQR (GenDX, Нидерланды) проводилась на 4 клинических и 4 контрольных образца ДНК с известными HLA-генотипами. Контрольные образцы ДНК были получены лабораторией для прохождения международного контроля качества в 2016 году. Клинические образцы представляли собой ДНК из периферической крови пациентов гематологических отделений, выделенную ручным методом с использованием реагентов QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия). Типирование контрольных образцов выполнялось по генам HLA-A и -DQB1, клинических образцов — по гену HLA-C. В качестве референсной методики высокоразрешающего типирования генов HLA использовалась стандартизованная и ранее применяемая в лаборатории методика моноаллельного секвенирования реагентами S4 Protrans (Protrans, Германия). Анализ полученных результатов выполнялся с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis, версия 5.3.1 (Applied Biosystems, США) и SBTengine, версия 3.17.0 (GenDX, Нидерланды).

Результаты. Выполнено типирование генов HLA в клинических и контрольных образцах ДНК с использованием реагентов AlleleSEQR (GenDX, Нидерланды) для биаллельного секвенирования и реагентов Protrans S4 (Protrans, Германия) для моноаллельного секвенирования по стандартизованной в лаборатории методике. Проведенное исследование показало полное соответствие наших результатов высокоразрешающего типирования, полученных с применением двух методик секвенирования, а также результатов HLA-типирования референсной лаборатории-организатора международного контроля качества. Валидированная нами методика секвенирования была внедрена в рутинную лабораторную практику и использована для исследования образцов ДНК, полученных от пациентов онкогематологических отделений и их потенциальных доноров. Высокорастворимое типирование генов HLA с использованием реагентов AlleleSEQR (GenDX, Нидерланды) было выполнено у 11 человек.

Выводы. Наборы реагентов AlleleSEQR (GenDX, Нидерланды) для секвенирования генов HLA совместимы с генетическим анализатором «Нанофор-05» (ИАП РАН, Россия). Использование данных наборов реагентов позволяет получать точные и достоверные результаты высокоразрешающего типирования генов HLA, сопоставимые с результатами моноаллельного секвенирования.

Рамильева И. Р., Буркитбаев Ж. К., Абдрахманова С. А. Турганбекова А. А.

Научно-производственный центр трансфузиологии Министерство здравоохранения Республики Казахстан, г. Астана

ХАРАКТЕР РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ HLA У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК, ПРОЖИВАЮЩИХ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Актуальность. Одним из первых шагов для развития трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТКСГ) в Казахстане было включение в Государственную программу развития здравоохранения Республики Казахстан на 2011 – 2016 годы «Саламатты Казахстан» положения о необходимости внедрения ТГСК и молекулярного метода типирования системы Human Leukocyte Antigens (HLA).

Несколько крупномасштабных исследований показали, что полное совпадение между донором и реципиентом по антигенам системы HLA способствует улучшению общей выживаемости трансплантата, уменьшению частоты и тяжести острой и хронической болезни «трансплантат против хозяина».

Цель исследования. Целью исследования является изучение распределения генетиче-

ского полиморфизма антигенов гистосовместимости у здоровых лиц, проживающих в Республике Казахстан.

Материалы и методы. Изучили частоту встречаемости HLA-антигенов I-класса и II-класса у здоровых лиц, проживающих в Казахстане. Обследовали 3646 потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток. Средний возраст донора составил 41 год (диапазон от 18 до 64 лет). Распределение по половому признаку среди доноров: лица мужского пола — 2161 (59 %) и женского пола — 1485 (41 %).

Препараты ДНК для проведения HLA-типирования были получены из свежей цельной крови (антикоагулянт — ЭДТА) методом колоночной фильтрации с использованием наборов реагентов PROTRANS DNA Box 500 Fast DNA. Концентрация препаратов ДНК, определенная на спектрофотометре UV-vis NanoDrop 2000 (Канада), составляла 25 – 40 нг/мкл при соотношении A260/A280 = 1,75 – 1,95. Образцы крови HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 локусов определяли молекулярно-генетическим методом на высоком разрешении на наборах Protrans (Protrans, Германия).

Результаты исследования. Проведенный анализ выявил характерный профиль распределения специфичностей системы HLA в казахстанской популяции.

При изучении особенностей распределения HLA-A отмечено, что антиген A*02 встречается в 49,8 % (данный антиген часто встречается в странах Европы, Северной, Южной и центральной Америки), A*24 был определен в 28,6 % случаев (отмечается в Северной и Юго-Восточной Азии), антиген A*03 был обнаружен у 19,4 % потенциальных доноров, A*11 — у 14,4 %.

В локусе B наиболее распространенными антигенами в нашей популяции явились B*35 (20 %), *40 (15,8 %), *07 (14,4 %), *44 (14,3 %),

*51 (14,1 %), *13 (14 %). При этом в других странах мира наиболее распространенными антигенами локуса B были другие виды.

Самым часто встречающимся в локусе C среди проживающих в Казахстане стал C*07 (37,9 %). При этом данный антиген преобладает в странах Европы. Также в казахстанской популяции часто обнаруживаются C*03 (29,5 %), *06 (26,1 %), *04 (19,2 %), *12 (18,9 %).

По HLA II классу в локусах DRB1, наиболее часто встречающимися оказались DRB1*04 (26,7 %), *07 (24,7 %), *15 (23,9 %). В локусе DQB1 наиболее часто встречались в нашем исследовании DQB1*06 (43,5 %), *02 (37,5 %). При этом, по данным allelefrequencies.net, HLA-DQB1*03 встречается у 64,8 % доноров в странах Европы, в Северо-Восточной, Юго-Восточной и Западной Азии.

Также следует отметить, что в ходе нашего исследования не были обнаружены антигены HLA-A*36; HLA-B*42, *59, *78, *81, *82, *83.

Заключение. Результаты нашего исследования показали, что среди населения Казахстана характерно определенное распределение антигенов. Относительно высокая частота встречаемости выявлена для следующих антигенов: HLA-A*02; A*03, *11, *24; HLA-B*07, *13, *15, *35, *40, *44, *51; HLA-C*03, *04, *06, *07, *12; HLA-DRB1 *04, *07, *15; HLA-DQB1*02, *03, *06.

Проводимое в рамках создания Регистра потенциальных доноров ГСК HLA-типирование народов, проживающих на территории Казахстана, дает возможность полностью охарактеризовать популяцию по лейкоцитарным антигенам. Данная антигенная характеристика популяции имеет большое значение для прогноза вероятности нахождения неродственного донора внутри страны и развития трансплантации ГСК в Республике Казахстан.

Рисинская Н. В., Чабаева Ю. А., Судариков А. Б., Куликов С. М.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ВАРИАНТЫ КОРРЕКЦИИ ЗАВЫШЕННЫХ ИЛИ ЗАНИЖЕННЫХ ЗНАЧЕНИЙ ХИМЕРИЗМА, РАССЧИТАННЫХ ПО РАЗНЫМ ЛОКУСАМ КОРОТКИХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ

Введение. Анализ профилей коротких тандемных повторов для вычисления доли ДНК донора и реципиента после трансплан-

тации костного мозга остаётся «золотым» стандартом мониторинга химеризма. Метод характеризуется высокой воспроизводи-

стью, достаточной чувствительностью для выявления более 1% минорной ДНК в образце, однако точность метода колеблется в зависимости от выбора маркеров химеризма. Известно, что эффективность амплификации в полимеразной цепной реакции разных аллелей гетерозиготного локуса может не совпадать. Если мы выбираем в качестве информативного маркера менее эффективно амплифицируемый аллель реципиента и соотносим его с более эффективно амплифицируемым аллелем донора, рассчитанный по этим маркерам результат оказывается сильно заниженным. В обратной ситуации — более эффективно амплифицируемый аллель реципиента и менее эффективно амплифицируемый аллель донора — результат будет завышен. Поэтому доля ДНК реципиента, вычисляемая в одном образце по разным маркерам, может флуктуировать в диапазоне 10% и даже выше. Ещё одна причина завышения значений химеризма — совпадение маркера реципиента со статтер-пиком маркера донора. Такие маркеры принято не брать в расчет, однако в случае трансплантации от близкого родственника, когда выбор маркеров химеризма ограничен, других вариантов может просто не быть.

Цель. Исследование «поведения» гетерозиготных аллелей и пар статтер/маркер во времени для последующей коррекции завышенных и заниженных значений химеризма.

Материалы и методы. Был проведен ретроспективный анализ архивных файлов профилей коротких tandemных повторов пациентов с сохраняющимся полным донорским химеризмом после трансплантации костного мозга, проведенной в НМИЦ гематологии. Исследовано соотношение эффективностей амплификации (соотношение высот пиков) для 14 гетерозиготных локусов ($n=5$ D12S391, $n=3$ D10S1248, $n=2$ D1S1656, $n=2$ SE33, $n=1$ vWA, $n=1$ D16S529) у 11 пациентов в нескольких временных точках (от 5 до 14 в зависимости от времени наблюдения за пациентом после ТКМ) для каждого. Разница в длине амплифицируемых фрагментов была более 8 пар нуклеотидов, что исключало возможное перекрытие со статтер-пиками друг друга. Кроме того, было исследовано соотношение высот пиков для 40 пар статтер/пик-хозяин в линейках образцов донор/пациент после ТКМ (для пациента от 5 до 14 вре-

менных точек при условии подтвержденного полного донорского химеризма).

Результаты. Для гетерозиготных локусов было показано, что соотношение эффективности ПЦР сохраняется во времени, и амплификат более короткого аллеля составляет от 54 до 62% от общего ПЦР продукта для данного локуса. Значит, можно ввести поправочный коэффициент для используемого в калькуляции химеризма маркера, учитывающий эффективность амплификации ($k = \text{высота пика более короткого амплификата} / \text{высота пика длинного амплификата}$). Для пар статтер/маркер-хозяин отношение статтера к суммарному сигналу статтера и информативного маркера сохраняется в воспроизводимых условиях проведения ПЦР. Причем информативный маркер может быть как основным пиком для этого статтера, так и реципрокным пиком в случае гетерозиготы. Для 11 из исследуемых маркеров, сопровождаемых статтерами, у 9 пациентов было проанализировано также по 8 параллельных проб в последней временной точке. Средние значения доли статтеров и стандартные отклонения в параллельных пробах были близки к этим же параметрам для доли статтера в разных временных точках, т. е. флуктуации доли статтера во времени сопоставимы с ошибкой измерения. Вероятно, отношение высоты статтера к сумме высот статтера и основного пика является индивидуальной константой для каждого выбранного маркера химеризма. Определив долю статтера по образцу ДНК донора, можно использовать маркеры со статтерами для калькуляции химеризма. Нами было показано, что при вычитании доли статтера из рассчитанного значения химеризма результат занижается незначительно, но более корректно использовать формулу $R = (A - \text{stutter}) / (1 - \text{stutter})$, где R — истинное значение химеризма, A — химеризм до учета доли статтера, stutter — доля статтер-пика в общем сигнале.

Выводы. используя сохраняющееся во времени соотношение эффективности ПЦР двух аллелей в гетерозиготе, а так же константный характер доли статтер-пиков, можно вводить корректирующие поправки для более точного расчёта химеризма.

Благодарности. работа поддержана грантом РФФИ 18-015-00399.

Семенов Г.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», г. Минск, Республика Беларусь

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДОНОРСКОГО РЕГИСТРА РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ С РЕГИСТРАМИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток входит в арсенал специализированной помощи при онкогематологических, иммунологических и других заболеваниях. Однако родственный совместимый донор обнаруживается только у 30 % пациентов, нуждающихся в этом виде лечения. Для 70 % пациентов требуется поиск неродственного HLA-совместимого донора, который осуществляется в национальных и международных регистрах HLA-типированных доноров. В Республике Беларусь банк HLA-типированных в учреждениях службы крови доноров ГСК насчитывает около 34000. Недостаточная численность реестра доноров приводит к необходимости взаимодействия с аналогичными регистрами, и первую очередь стран СНГ. Однако следует учитывать, что генетические различия между представителями разных этнических групп населения могут отразиться и на частоте встречаемости HLA-параметров.

Цель исследования. Изучить полиморфизм генов HLA II класса среди потенциальных доноров регистров Беларуси, России и Казахстана.

Материалы и методы. Определение генов II класса системы HLA локуса DRB1* методами молекулярно-генетического типирования. Технология с использованием метода обратной гибридизации с олигонуклеотидными зондами (PCR-SSO) позволяет проводить скрининговое HLA генотипирование в автоматическом режиме. Генотипирова-

ние образцов крови потенциальных доноров гемопоэтических клеток проводится на платформе «BeeBlot, AutoRELI 48» реагентами «FUJIREBIO», Бельгия для локуса HLA-DRB1* с уровнем разрешения от «низкого» к «среднему». Интерпретация результатов и управление системой обеспечивается сканирующим устройством RELI-Scan и компьютерной программой LIRAS. При неоднозначных результатах генотипирования проводится подтверждающее типирование по технологии PCR-SSP с использованием аллель-специфических праймеров. В работе использовались наборы «OLERUP», Швеция с лиофилизированными праймерными смесями «низкого» и «высокого» разрешения.

Результаты. Результаты проведенного иммуногенетического анализа свидетельствуют о том, что во всех представленных регистрах встречаются с различной частотой все гены локуса HLA DRB1*. В Казахском регистре по сравнению с Белорусским и Российским у доноров преобладают гены DRB1* 09, 10, 12 и достоверно увеличен DRB1*14 при заметном снижении DRB1* 16.

Выводы. Близкие значения большинства генов локуса DRB1* в рассматриваемых регистрах создают предпосылки взаимодействия (объединения) регистров России, Беларуси и Казахстана. Вышеуказанные различия позволяют в ряде случаев, касающихся редких генов, проводить взаимодополнение для более эффективного поиска совместимого по системе HLA донора.

Семенова Н. Ю.¹, Бессмельцев С. С.¹, Грицаев С. В.¹, Енукашвили Н. И.², Ругаль В. И.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

² Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург

РОЛЬ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ НИШИ В ПРИЖИВЛЕНИИ ГСК ПРИ АУТОЛОГИЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Введение. Множественная миелома (ММ) — заболевание, обусловленное злокачественной трансформацией В-лимфоцита, при котором происходит развитие клона миеломных клеток, пролиферирующих в интрамедуллярных пространствах костной ткани. Наряду с характерными для гемобластозов чертами ММ имеет ключевые отличительные особенности — длительная локализация пролиферирующих миеломных клеток в костномозговых пространствах без выхода в циркуляцию, и выраженные нарушения остеогенеза. Несмотря на развитие различных методов лечения множественной миеломы, излечения не происходит, что связано с разными факторами, в том числе, с гетерогенностью микроокружения костного мозга. Один из наиболее эффективных методов лечения у больных ММ — аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (АутоТГСК), позволяет существенно уменьшить объем клеток патологического клона и повысить качество ответа. Тем не менее, остаются группы пациентов с неэффективной АутоТГСК, которая проявляется неудачной мобилизацией или ранним рецидивом после процедуры. Успех АутоТГСК зависит от многих причин, среди которых важную роль играет состояние ниши ГСК, поврежденной как вследствие основного заболевания, так и подвергшейся токсическому воздействию агрессивного лечения.

Цель. Оценить морфофункциональные особенности основных стромальных компонентов ниши гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) у пациентов с ММ и неэффективной АутоТГСК.

Материал и методы. Материал исследований — трепанобиоптаты подвздошной кости 12 больных с прогрессирующей ММ (5 мужчин и 7 женщин) в возрасте 52 – 68 лет (медиана 57 лет). У 7 пациентов неэффективная мобилизация ГСК, у 5 — ранний рецидив после АутоТГСК. У 5 пациентов были выделены мезенхимальные стромальные клетки (МСК).

В работе использовались гистологические, иммуногистохимические, культуральные методы исследования. Контрольную группу составили 5 доноров КМ.

Результаты. При гистологическом исследовании в костном мозге (КМ) больных ММ обнаруживалась неоднородная клеточная инфильтрация миеломными клетками: очаговая (2 случая), интерстициальная 5 – 10 % поражения (4 случая) и 20 – 30 % поражения (4 случая), диффузная (2 случая). В половине случаев (6 пациентов) объем поражения КМ не превышал 10 %. Однако соотношение нишеобразующих элементов было отличным от таковых в КМ здоровых доноров. У всех пациентов отмечалось увеличение количества микрососудов, особенно в субэндостальной зоне $15,2 \pm 2,8$ % по сравнению с $9,1 \pm 1,2$ % в контрольной группе ($p < 0,05$). На эндосте отмечается увеличение количества клеток на единицу длины костной трабекулы $2,7 \pm 0,5$ по сравнению с $1,4 \pm 0,2$ в контроле ($p < 0,05$). Также в субэндостальной зоне и вокруг синусов КМ отмечалось усиление экспрессии коллагена IV типа и зоны ярко выраженного ретикулинового склероза.

При культуральных исследованиях МСК КМ больных ММ по сравнению со здоровыми донорами наблюдалась задержка экспоненциальной фазы роста и удлинение лаг-фазы. После лечения только у части больных происходит восстановление кривой роста до показателей доноров. Остеогенно-дифференцировочная активность различна у МСК КМ при ММ и не восстанавливается полностью после АутоТГСК. Отмечалось усиление экспрессии маркеров, ассоциированных с миофибробластоподобным фенотипом и старением (гладко-мышечный актин, β -галактозидаза). После лечения β -галактозидаза синтезируется слабее, чем до лечения, в то время как МСК КМ здоровых доноров КМ данный фермент практически не синтезируют. Был исследован цитокиновый профиль при сокультивировании культур МСК от пациентов с миеломной

культурой RPMI-8226. МСК КМ пациентов после лечения существенно отличаются от МСК здоровых доноров и пациентов с ММ по реакции на присутствие миеломных клеток. МСК КМ после лечения активно синтезируют IL-10 и IFN- γ по сравнению с МСК КМ при ММ и МСК КМ здоровых доноров. При сокультивировании с ММ МСК КМ леченых пациентов снижается синтез IFN- γ и TNF, вырастает выработка IL-10, а уровень синтеза VEGF практически не меняется.

Выводы. Таким образом, было показано, что культуры МСК и нишеформирующие элементы КМ пациентов с ММ обладают чертами

опухоль-ассоциированного микроокружения, несмотря на проведенное лечение основного заболевания. В данном исследовании показано, что ниша ГСК в КМ у больных с ММ отличается от таковой у здоровых доноров КМ. Морфофункциональные особенности основных элементов ниши КМ могут быть причиной нарушений в регуляции развития ГСК и их приживления при АутоТГСК.

Работа поддержана Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-6706.2018.7.

**Старшинова А. А.^{1,2}, Овчинникова Ю. Э.¹, Беркос А. С.³,
Соколова Ю. В.³, Бубнова Л. Н.³, Яблонский П. К.^{1,2}**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ HLA-DQB1 И HLA-DRB1 У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Введение. Развитие инфекционного процесса определяется не только свойствами возбудителя, но и способностью макроорганизма формировать адекватный иммунный ответ, что в свою очередь обусловлено иммуногенетическими особенностями организма. В настоящее время установлена важная роль генетической предрасположенности индивидуума к развитию различных заболеваний, в том числе и инфекционных. **Изучение особенностей распределения антигенов HLA-DRB1 и DQB1** может выявить аллели, ассоциированные с развитием генерализованных форм туберкулеза у детей, что послужило основанием для настоящего исследования.

Цель исследования. выявить особенности распределения антигенов HLA-DRB1 и DQB1 у детей с генерализованными формами туберкулеза.

Материалы и методы. В клинике ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава РФ (отделение детской хирургии костно-суставного туберкулеза у детей и подростков) и в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России с 2008 по 2015 гг. обследовано 40 детей в возрасте от 1 года до 15 лет с генерализованным туберкулезом. Группа по-

пуляционного контроля для сравнения результатов HLA – типирования представлена 100 здоровыми жителями Северо-западного региона России (доноры крови).

Всем детям проведен стандартный комплекс фтизиатрического обследования с включением иммунологических (проба Манту с 2 ТЕ и проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным), иммуногенетических, лучевых (выполняли компьютерную томографию органов грудной клетки и костно-суставного аппарата на многосрезовом спиральном компьютерном томографе «Aquilion-32» (фирма Toshiba) по стандартной методике) и лабораторных методов (исследование респираторного материала: промывные воды бронхов, мокрота, смывы из бронхов, и операционного материала с использованием бактериоскопии, посева на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена, Финна 2, посева на жидкую питательную среду ВАСТЕС MGIT 960, и метода ПЦР в реальном времени с использованием системы амплитуд – RW — производитель «Синтол», Россия) для выявления микобактерий туберкулеза.

Определение антигенов DQB1 и DRB1 на уровне базового разрешения проводилось в Республиканском центре иммунологического типирования тканей (EFI аккредитованная лаборатория) методом PCR SSP с использованием коммерческих наборов сиквенс-специфических праймеров. Визуализация продуктов, полученных в результате полимеразной цепной реакции, проводилась посредством электрофореза в горизонтальном агарозном геле.

Проведен анализ материала с применением методов параметрической и непараметрической статистики, а также расчет показателей: величины относительного риска (RR), превентивной фракции (PF), достоверность различий между группами оценивалась с помощью критерия Хи-квадрат.

Результаты и их обсуждение. В фенотипе пациентов по сравнению с контролем выявлены достоверные различия в частоте встречаемости отдельных сочетаний генов. Увеличение частоты внутриллокусного соче-

тания DRB1*03,*04 и межлокусного сочетания DRB1*03 DQB1*06 среди детей с генерализованной формой туберкулеза свидетельствует о возможной связи данных фенотипов с предрасположенностью к развитию такого течения инфекционного процесса. Установленное достоверное уменьшение частоты сочетаний DRB1*01 DQB1*05 и DRB1*01 DQB1*06 свидетельствует о возможном протективном свойстве данных фенотипов в отношении развития генерализованной формы туберкулеза у детей.

Заключение. Выявленные особенности в распределении антигенов локусов DQB1 и DRB1 позволяют осуществлять персонализированный подход к прогнозу развития генерализованных форм туберкулеза у инфицированных микобактериями туберкулеза детей и проводить более длительное наблюдение пациентов с фенотипической предрасположенностью к развитию тяжелых форм заболевания.

Старшинова А. А.^{1,2}, Овчинникова Ю. Э.¹, Бубнова Л. Н.³, Яблонский П. К.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ HLA-DRB1 У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ И ЛОКАЛЬНЫМИ ФОРМАМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Введение. По данным ВОЗ, туберкулезом болеет более миллиона человек в год, так, в 2014 году впервые заболевание было диагностировано у 9,6 миллионов человек, а 1,5 миллиона умерло от туберкулезной инфекции, в том числе 140 000 детей.

В последние годы отмечается некоторая стабилизация и снижение показателей заболеваемости и смертности от туберкулеза, что приводит к снижению числа впервые выявленных детей с туберкулезной инфекцией. Показатель заболеваемости туберкулезом детей в возрасте от 0 до 14 лет уменьшился за последние годы на 7,7 % (2013 год – 14,3; 2014 год – 13,2; 2015 – 12,4, 2016 – 11,5 на 100 000 детей) (Нечаева О. Б., 2017). Ведущей формой туберкулеза по-прежнему

остается туберкулез внутригрудных лимфатических узлов, который диагностируется в 75 – 76 % случаев. Генерализованные формы заболевания встречаются значительно реже, что обусловлено общим снижением заболеваемости. Внегочечные локализации регистрируются в 4,6 % случаев в зависимости от возрастной группы (от 3,7 % — в возрасте от 7 до 14 лет, и до 5,9 % — от 0 до 4 лет), при этом доля их за последние 15 – 16 лет имеет тенденцию к уменьшению (Шилова М. В., 2015). Как известно, туберкулез — мультифакториальное заболевание. При взаимодействии организма с *M. tuberculosis* происходит активация собственного иммунитета, регуляция которого в значительной степени зависит от HLA-генотипа. Попытки найти

комбинации HLA генов, ассоциированных с развитием инфекционного процесса у человека, и доказать взаимосвязь изменений иммунного ответа продолжают на протяжении многих лет. Однако до настоящего времени нет четкого понимания причин возникновения генерализации инфекции у детей.

Цель исследования. выявить особенности распределения антигенов HLA-DRB1 у детей с генерализованным и локальными формами туберкулеза.

Материалы и методы. В клинике ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава РФ (отделение детской хирургии костно-суставного туберкулеза у детей и подростков) и в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России с 2008 по 2016 гг. обследовано 188 детей в возрасте от 1 года до 14 лет с различными проявлениями туберкулезной инфекции. Группа популяционного контроля для сравнения результатов HLA – типирования представлена 346 здоровыми жителями Северо-западного региона России (доноры крови).

На основании полученных при обследовании данных туберкулез исключили у 90 (47,9 %) детей, Локальная форма заболевания диагностирована у 98 детей (I группа); 51 ребенок (52,1 %) с туберкулезом внутригрудных лимфатических узлов (ТВГЛУ); 4 ребенка имели очаговые и инфильтративные изменения в легких с бактериовыделением. Генерализованный туберкулез был выявлен у 44 (44,9 %) пациентов (II группа) с изолированными специфическими поражениями в костно-суставном аппарате, а также в сочетании с туберкулезным поражением легких, внутригрудных лимфатических узлов, 2 — с туберкулезным менингитом, 2 — с поражением почек, 1 — с абдоминальным туберкулезом.

Всем детям проведен стандартный комплекс фтизиатрического обследования с включением иммунологических, лучевых и лабораторных методов диагностики.

Молекулярно-генетическое типирование аллелей генов HLA-DRB1 выполняли на уровне базового разрешения посредством полимеразной цепной реакции (PCR-SSP) с панелью сиквенс-специфических праймеров с помощью стандартных коммерческих наборов реагентов PROTRANS Cyclerplate System Protrans HLA-DRB1*, позволяющих определить следующие группы аллелей: HLA DRB1: *01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16 в Республиканском центре иммунологи-

ческого типирования тканей (ЕФИ аккредитованная лаборатория).

Статистический анализ проводили с применением программы Microsoft Office Word Excel 2007, а также пакета прикладных программ Statistica 6.0 фирмы Stat.Soft. Inc. (США). Проведен анализ материала с применением методов параметрической и непараметрической статистики, а также расчет показателей: величины относительного риска (RR), превентивной фракции (PF), достоверность различий между группами оценивалась с помощью критерия Хи-квадрат.

Результаты и их обсуждение. На основании результатов иммуногенетического обследования двух выделенных групп детей установлены следующие особенности и различия. У больных туберкулезом детей (II группа) достоверно чаще (36,7 %), чем в группе популяционного контроля (21,1 %), встречается HLA-DRB1*04 ($\chi^2 = 10,08$; $p < 0,01$). Показатель относительного риска (RR = 2,17) и этиологической фракции (EF = 0,19) указывают на предрасполагающую роль этой группы аллелей в развитии туберкулезного процесса. Кроме того, в этой же группе отмечалась редкая встречаемость аллелей HLA-DRB1*07 (14,3 % против 27,5 %, $\chi^2 = 7,15$, $p < 0,01$) и 15* (18,4 % против 28,3 %, $\chi^2 = 3,92$; $p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой. Показатели *07 (RR=0,44; PF=0,15), также как *15 (RR=0,56; PF=0,12) аллелей HLA-DRB1 ниже 1,0, что подтверждает их протективную роль.

Анализ особенностей распределения специфичностей HLA-DRB1 показал: при сопоставлении частоты встречаемости генов HLA-DRB1 в исследуемых группах установлено достоверное снижение частоты DRB1*01 у детей с генерализованным туберкулезом по сравнению с группой здоровых лиц, что может быть связано в данном случае с его протективными свойствами. Увеличение частоты внутрилокусного сочетания DRB1*03 DRB1*04 среди детей с генерализованной формой туберкулеза свидетельствует о возможной связи данного фенотипа с предрасположенностью к развитию такого течения инфекционного процесса. Следует отметить, что аллели DRB1*03 и DRB1*04 прочно ассоциируются с предрасположенностью к аутоиммунным заболеваниям, в частности, к аутоиммунным эндокринопатиям. Это лишнее подтверждает ключевую роль иммуноге-

нетических факторов в развитии и характере течения туберкулёза.

Заключение. Полученные данные демонстрируют значимость генетического статуса в развитии туберкулезной инфекции у детей. Наличие в генотипе HLA-DRB1*04 группы ал-

лелей свидетельствует о предрасположенности к развитию туберкулеза у детей, а также значимость особенностей HLA-DRB1, а именно снижение частоты встречаемости группы аллелей DRB1*01, на развитие генерализованной формы туберкулёза у детей.

Трусова Л. М.¹, Ключников Д. Ю.¹, Вавилов М. Н.², Сулова Т. А.², Тюмина О. В.¹

¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Самарский областной медицинский центр Династия», Самара

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет», Челябинск

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ HLA-АЛЛЕЛЕЙ И ГАПЛОТИПОВ В РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ САМАРСКОЙ И ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Введение. Российская Федерация является одним из самых многонациональных государств мира — представители 190 национальностей проживают на территории страны. Самый многочисленный народ — русские, их численность составляет 111 016 896 человек или 77,71 % в доле населения России. Согласно данным последней переписи населения 2010 года 89,47 % жителей Самарской области и 86,53 % жителей Челябинской области относят себя по этнической принадлежности к русским.

Цель. Целью настоящей работы было сравнение частот встречаемости HLA-аллелей и гаплотипов среди русской популяции Самарской и Челябинской областей.

Материалы и методы. HLA-типирование было проведено с помощью методов SSO и SSP на низком уровне разрешения по локусам A, B и DRB1. Проанализированы результаты HLA-типирования 2795 единиц пуповинной крови, находящихся на хранении в банке ГБУЗ «МЦ Династия» и 591 донора кроветворных клеток регистра ГБУЗ «ЧОСПК». Подсчет частот встречаемости аллелей и гаплотипов проводился с использованием EM алгоритма и программного обеспечения Arlequin v3.5. Родители детей, чья кровь находится на хранении в публичном банке, и потенциальные доноры прошли анкетирование для определения национальности и постоянно проживают на территории Самарской и Челябинской областей.

Результаты. Наиболее частые аллели были одинаковы у обеих популяций. Однако мы нашли существенные отличия в частоте встречаемости A*02 (27,3 % в популяции Самарской области против 30,7 % в популяции Челябинской области), A*30 (3,3 % против 1,1 %), A*68 (4,4 % против 2,7 %), B*07 (10,8 % против 13,2 %), B*14 (3,0 % против 1,9 %), B*45 (0,1 % против 0,4 %). В частотах встречаемости аллелей локуса DRB1 существенных отличий выявлено не было. Несмотря на то, что были выявлены некоторые различия в частотах встречаемости аллелей, наиболее частые гаплотипы (а именно, 10 наиболее частых) в обеих популяциях были одинаковы: A*01-B*08-DRB1*03, A*03-B*07-DRB1*15, A*03-B*35-DRB1*01, A*02-B*13-DRB1*07, A*02-B*07-DRB1*15, A*02-B*41-DRB1*13, A*25-B*18-DRB1*15, A*24-B*07-DRB1*15, A*02-B*27-DRB1*01 и A*26-B*38-DRB1*13.

Выводы. Таким образом, в русской популяции Самарской и Челябинской областей были отмечены некоторые различия в частотах встречаемости HLA-аллелей, но, с другой стороны, 10 наиболее частых гаплотипов были одинаковы. Данные о частотах встречаемости аллелей и гаплотипов HLA могут быть использованы в области популяционной генетики, установления ассоциаций с заболеваниями, разработке стратегий для HLA-типирования и поиска в регистрах доноров кроветворных клеток.

Турганбекова А. А., Буркитбаев Ж. К., Абдрахманова С. А., Рамильева И. Р.

Научно-производственный центр трансфузиологии Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Астана

УРОВЕНЬ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ЛЕЙКОЦИТАРНЫМИ АНТИТЕЛАМИ ПАЦИЕНТОВ С ОСТРЫМ ЛЕЙКОЗОМ

Введение. Обеспечение иммунологической безопасности переливания компонентов крови остается важнейшей проблемой трансфузиологии. В ее решении основное значение принадлежит мероприятиям, направленным на предупреждение аллосенсибилизации реципиентов и профилактику посттрансфузионных реакций и осложнений.

Цель. Изучить уровень сенсибилизации пациентов, получающих гемотрансфузии тромбоцитов в Казахстане.

Материалы и методы. В Научно-производственном центре трансфузиологии города Астаны было обследовано 23 пациента с гематологическими заболеваниями, получающих гемотрансфузии тромбоцитов, для установления уровня сенсибилизации. Забор крови проводился трижды: в первый день при поступлении пациента в отделение и дважды с интервалом 2 недели. Образцы сывороток пациентов обследовались на наличие лейкоцитарных, направленных на антигены первого класса HLA-системы. Использовали метод проточной цитофлуорометрии на анализаторе LABScan 3D (One Lambda, USA).

Результаты исследования. Обследование сывороток, полученных до проведения трансфузии тромбоцитов, показало наличие лейкоцитарных антител к I классу HLA у 14 (61 %) пациентов, у 9 (39 %) пациентов лейкоцитарных антител не было обнаружено. Мониторинг антител среди 9 пациентов с негативным статусом показало, что у 7 пациентов антитела были обнаружены в сыворотке, полученной через 2 недели от начала гемотрансфузионной терапии. У 2 пациентов положительный результат был получен по истечении 4 недель. Двух- и четырехнедельный мониторинг антител среди 14 пациентов с положительным статусом показал повышение уровня сенсибилизации.

Выводы. Мониторинг сенсибилизации к антигенам HLA I-класса путем определения антилейкоцитарных антител показал, что многократные переливания тромбоцитов приводят к увеличению процента сенсибилизированных пациентов. Исходя из этого, необходимо переливание тромбоцитов с индивидуальным подбором, учитывая HLA-антигены донорских клеток и пациента.

Турганбекова А. А.¹, Буркитбаев Ж. К.¹, Абдрахманова С. А.¹, Рамильева И. Р.¹, Оспанова М. Е.¹, Нурғалиев Д. Ж.²

¹ Научно-производственный центр трансфузиологии Министерства здравоохранения Республики Казахстан, г. Астана
² «Национальный научный центр материнства и детства» корпоративного фонда «University Medical Center», г. Астана

АЛЛОГЕННАЯ НЕРОДСТВЕННАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КАЗАХСТАНЕ

Введение. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) является одним из ведущих методов лечения пациентов с рецидивами острых лейкозов и другими онкогематологическими, а также аутоиммунными, наследственными заболеваниями и иммунодефицитными состояниями. Ежегодно в Казахстане в ТГСК нуждаются около 80 – 100 детей. Только у 25 % пациентов возможно нахождение родственных доноров.

Проведение неродственных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток в Республике Казахстан стало возможным, благодаря функционированию Национального Регистра потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток Республики Казахстан.

Цель. Оценка приживления трансплантата от неродственного донора гемопоэтических стволовых клеток у пациента с острым лимфобластным лейкозом.

Материалы и методы. В Научно-производственном центре трансфузиологии города Астаны для формирования Национального Регистра потенциальных доноров ГСК было обследовано 4310 потенциальных доноров по антигенам пяти локусов HLA-системы HLA-A*, B*, Cw*, DRB1*, DQB1* на высоком разрешении.

Пациенту, 2006 года рождения, с диагнозом острый лимфобластный лейкоз, было проведено типирование на высоком разрешении методом секвенирования по локусам HLA-A*, B*, C*, DRB1*, DQB1*. Секвенирование проводилось в прямом и обратном направлении экзонов 2,3 и 4 для локусов HLA-A*, B* и C*, для локуса DRB1* 2 экзон, для DQB1 локуса 2 и 3 экзоны.

Поиск совместимого донора среди родственников не дал положительного результата. При поиске неродственного донора из Национального Регистра потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток Республики Казахстан, был найден донор с совместимостью из 9/10, с одним mismatch в локусе A.

Учитывая тяжесть состояния пациента, первичную резистентность болезни к химиотерапии, было принято решение о проведении неродственной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Было проведено две процедуры получения ГСК из периферической крови донора на аппарате Spectra Optia. При первой процедуре

собрано CD34+ 5,1 x 10⁶/кг, при втором CD34+ 1,7 x 10⁶/кг.

Пациенту был проведен миелоаблативный режим кондиционирования: с 6 дня по 4 день — треосульфан, с 6 дня по 2 день — флударабин, 2 день — мелфалан, 0 день — трансплантация ГСК.

Результаты исследования. На 17 день констатировано приживание донорского костного мозга. Результаты общего анализа крови: лейкоциты 1,02 тыс, гемоглобин 83 г/л, эритроциты 2,84 млн., тромбоциты 50 тыс, нейтрофилы 640 кл/мкл.

На 43 день проведено исследование на молекулярный химеризм и результат показал замещение костного мозга пациента донорским на 99%. В ОАК лейкоциты 1,92 тыс, гемоглобин 94 г/л, эритроциты 2,98 млн., тромбоциты 60 тыс, нейтрофилы 840 кл/мкл. Наблюдалась кожная форма РТПХ легкой степени.

В настоящее время общее состояние пациента удовлетворительное, пациент получает такролимус.

Выводы. Для проведения успешных аллогенных неродственных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток необходимо дальнейшее развитие Регистра потенциальных доноров ГСК на высокоразрешающем типировании, что значительно сокращает время и упрощает поиск совместимого донора.

Февралева И. С., Рисинская Н. В., Судариков А. Б.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ВЫЯВЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ МАРКЕРОВ ТРОМБОФИЛИИ В ПАРЕ ДОНОР/РЕЦИПИЕНТ ТКМ.

Введение. Процесс восстановления кроветворения у пациентов после трансплантации донорского костного мозга (ТКМ) во многом зависит от генетических особенностей пары донор/реципиент, связанных не только с HLA совместимостью. Полиморфизмы, являющиеся факторами риска возникновения различных заболеваний, никак не проявляющихся до ТКМ, могут стать причиной серьезных осложнений после нее. Среди этих факторов и полиморфизмы, являющиеся маркерами тромбофилии. Часто

описывают посттрансплантационные тромбозы глубоких вен и тромбоэмболии. Кроме того, после ТКМ могут образовываться микротромбы, которые приводят к развитию различного рода воспалений и инфекций. Выявление генетических факторов риска тромбофилии может иметь значение для прогнозирования таких состояний. Представлены результаты исследования полиморфизмов генов F5 G1691A, MTHFR C677T, F2 G20210A и PAI-1 5G(-675)4G в парах донор/реципиент ТКМ.

Цель. Проанализировать значение несопададения донора и реципиента ТКМ по полиморфным аллелям генов F5, MTHFR, F2 и PAI-1 для развития посттрансплантационных тромботических осложнений.

Материалы и методы. ДНК из образцов крови доноров и реципиентов ТКМ выделяли фенольно-хлороформной экстракцией с последовательным осаждением в изопропанол и этаноле. Полиморфизмы F5 G1691A (rs6025), MTHFR C677T (rs1801133),

F2 G20210A (rs1799963), PAI-1 5G(-675)4G (rs1799889) определяли с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции в реальном времени (АС-ПЦР-РВ) в модификации TaqMan на приборе RotorGene (Corbett Research). Пробы и зонды собственного дизайна приведены ниже. Условия реакции: предварительная денатурация при 95° – 300 сек, затем 45 циклов 63° – 50 сек и 95° – 15 сек.

FV_WC-F	5'caaggacaaaatacctgtattccac3'	PAI_5G-F	5'agtctggacacgtgggtg3'
FV_MT-F	5'caaggacaaaatacctgtattccat3'	PAI_4G-F	5'agtctggacacgtgggta3'
FV_com-R	5'gacatcgctctgggcta3'	PAI_R	5'cagccacgtgattgtctagg3'
F2_W-F	5'actgggagcattgaggatc3'	MTHFR_W-F	5'gagaagggtctctcggtagc3'
F2_M-F	5'actgggagcattgaggatt3'	MTHFR_MT-F	5'gagaagggtctctcggtagt3'
F2_R	5'tggaaccaatcccgtgaag3'	MTHFR_R	5'tagccctggatgggaagatc3'
F2_ROX	5' (ROX)gagagtcactttattgggaacctag(BHQ2)		
FV_FAM	5' (FAM)gcctgtccaggg(BHQ1)atctgctttac3'		
MTHFR_R&G	5' (R&G)atgcaccgacat(BHQ1)gggcatcacttg3'		
PAI_Cy5	5' (Cy5)agccgtgtatca(BHQ3)tcggaggcgg3'		

Результаты. Было протестировано 90 пар донор/реципиент. Факторами риска возникновения тромбофилии считали гомо/гетерозиготность по полиморфизмам rs6025 в гене F5, rs1799963 в гене F2 и гомозиготность по rs1801133 в гене MTHFR и rs1799889 в гене PAI-1. Были выявлены 4 реципиента и 6 доноров, являющихся гетерозиготами по G1691A, и не являющихся трансплантационными парами, три донора и реципиента, являющихся парой при ТКМ и несущих одновременно гетерозиготную мутацию G1691A, один реципиент и один донор, являющиеся гетерозиготами по G20210A, 5 реципиентов и 6 доноров, гомозиготы по C677T, и 12 реципиентов и 21 донор, гомозиготы по PAI-1 5G(-675)4G. Анализ историй болезни реципиентов, являющихся гетерозиготами G1691A (мутация Лейдена), показал, что у некоторых из них

развились тромбозы глубоких вен вскоре после ТКМ. У одной пациентки без мутаций возникла тромбоэмболия легочной артерии вскоре после ТКМ от донора с мутацией G1691A. Причина ТЭЛА не ясна. Известно, что факторы свертывания вырабатываются в основном клетками печени. Однако тромбоцитарный F5 синтезируется и в мегакариocyтах и, таким образом, донорский дефектный F5 может играть роль после ТКМ. В любом случае необходимо дальнейшее наблюдение за реципиентами, имеющими маркеры тромбофилии свои или донорские.

Выводы. Мы полагаем, что для оценки риска посттрансплантационных тромбозов имеет значение генетический анализ полиморфизмов факторов, являющихся риском возникновения тромбофилии, в паре донор/реципиент.

**Хамаганова Е. Г., Кузьмина Е. П., Абдрахимова А. Р.,
Чапова Р. С., Чугреева Т. П., Васюков К. В., Гапонова Т. В., Савченко В. Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

HLA-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДИСТАНЦИИ МЕЖДУ ДОНОРАМИ РЕГИСТРА «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ», РОССИЙСКИМИ И НЕКОТОРЫМИ ЗАРУБЕЖНЫМИ ПОПУЛЯЦИЯМИ

Введение. Распределение *HLA*-генов и гаплотипов зависит от расовой и этнической принадлежности. Информация о вариациях *HLA*-генов в различных популяциях в разных географических регионах способствует успешному поиску донора для трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК).

Цель исследования — провести анализ генетических дистанций (g. d.) по генам *HLA-A**, — *B**, — *DRB1** между донорами регистра «НМИЦ гематологии», российскими и некоторыми зарубежными популяциями, о которых имеются сведения, доступные в открытой печати или в базе данных — <http://www.allelefrequencies.net>.

Материалы и методы. В исследование вошли 2230 потенциальных доноров костного мозга (КМ) регистра «НМИЦ гематологии», которые самоопределились как этнически русские. ДНК выделяли из периферической крови, взятой с антикоагулянтом ЭДТА, при помощи станции для выделения ДНК NorDiag Argow (Norway). *HLA*-типирование проводили методом гибридизации с олигонуклеотидными зондами (SSO) — Immucor Transplant Diagnostic, Inc. (USA) на платформе анализатора Luminex 200 по пяти генам *HLA-A**, — *B**, — *C**, — *DRB1**, — *DQB1**. Частоты групп *HLA*-аллелей и соответствия наблюдаемого распределения равновесию Харди – Вайнберга определяли с помощью компьютерной программы Arlequin 3.5 методом максимального правдоподобия при помощи алгоритма максимизации ожидания. Для анализа g. d. использовались данные российских и некоторых зарубежных популяций, которые представлены в базе данных [allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net) (AF — <http://www.allelefrequencies.net>) и открытой литературе. Всего привлечены данные по 52 популяциям, включая доноров-москвичей регистра «НМИЦ гематологии», которые самоопределились как русские, доноров «НМИЦ гематологии» — осетин из Вла-

дикавказ и 10 иных российских популяций, исследованных другими коллективами авторами. Критерий включения популяции в анализ — данные минимально по группам аллелей *HLA-A*-B*-DRB1** генов, сумма частот гаплотипов по каждому *HLA*-гену равная 1. Расчёт генетических расстояний проводили по методу Нея с помощью программы Phylip 3.695, как и построение филогенетических деревьев.

Результаты. Доноры-москвичи, самоопределившиеся как русские, близки по частотам групп аллелей *HLA*-генов к другим популяциям русских и некоторым славянским популяциям. Наиболее приближены к донорам-русским из Москвы самарцы, новосибирцы, русские из Челябинска, и поляки, g. d. < 0,1. Несколько дальше отстоят русские из Карелии (g. d.=0,131); Кировской области (g. d.=0,136); население Башкортостана — этнически смешанная популяция, состоящая в основном из представителей трёх групп — башкир, русских и татар (g. d.=0,170); население Северо-Западного региона (g. d.=0,198); татары Челябинской области (g. d.=0,24) и Татарстана (g. d.=0,338). Наиболее удалёнными по *HLA*-генам от доноров-москвичей из российских популяций были башкиры Челябинской области (g. d.=1,075), осетины (g. d.=1,283) и тувинцы (g. d.=1,593). Из включённых в анализ славянских популяций наиболее близки к донорам-москвичам — поляки и словаки (g. d.=0,123), чехи (g. d.=0,143), удалены — хорваты (g. d.=0,230) и сербы (g. d.=0,401). Наиболее удалёнными от москвичей европейскими популяциями являлись баски (g. d.=1,66) и саами (g. d.=3,012). Наибольшая генетическая дивергенция у доноров-москвичей наблюдалась с аборигенами Австралии и индейцами Северной и Южной Америки (g. d. от 8,204 до 29,519).

На отсутствие значительной дивергенции между популяциями русских указывает взаимное расположение этих популяций

(«листья») на филогенетическом дереве, а также незначительная длина ветвей, на которых они располагаются. Ветвь, к которой относятся тувинцы, отпочковывается вместе с монгольской ветвью от одного вышележащего узла. Ветвь, на которой располагаются осетины — единственный народ Северного Кавказа, язык которого относится к иранской группе индоевропейской семьи, отпочковывается от одного узла с популяциями Юго-Восточной Европы/Юго-Западной Азии. На своеобразность этой популяции указыва-

ет значительная длина ветви, на которой расположен осетинский «лист».

Выводы. Генетическая дивергенция по HLA-генам между различными популяциями русских незначительна. Однако российские популяции разного этнического происхождения отличаются существенным HLA-генетическим разнообразием, поэтому необходимо привлекать в российские регистры доноров из различных регионов России с разными этническими составами.

**Хамаганова Е. Г., Кузьмина Е. П., Абдрахимова А. Р.,
Кузьмина Л. А., Паровичникова Е. Н., Савченко В. Г.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

HLA-DPB1-НЕСОВМЕСТИМОСТЬ ПРИ РОДСТВЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Введение. Типирование гена HLA-DPB1 не является обязательным при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) из-за низкой экспрессии HLA-DP-молекул. Однако между генами локуса HLA-DP и остальными классическими генами HLA находится «горячая точка рекомбинации», поэтому совпадение донора и реципиента по 10 из 10 аллелей генов HLA-A,— B,— C,— DRB1,— DQB1 не всегда сопровождается совпадением по HLA-DPB1. По данным литературы, из-за слабого неравновесного сцепления 1 – 2 % HLA-идентичных сиблингов не совпадают по HLA-DP. При неродственной алло-ТГСК несовпадение по HLA-DPB1 встречается примерно у 80 % пар, совпавшим по HLA-A,— B,— C,— DRB1,— DQB1, при этом два несовпадения по аллелям HLA-DPB1 сопровождаются повышением вероятности развития болезни трансплантат-против-хозяина (РТПХ).

Цель исследования — исследовать частоту несовпадений донора и реципиента по гену HLA-DPB1 при алло-ТГСК от родственного донора.

Материалы и методы. В исследование вошли 67 больных, которым в отделении ТКМ «НМИЦ гематологии» была выполнена алло-ТГСК от HLA-A,— B,— C,— DRB1,— DQB1-идентичного сиблинга, и их доноры, а также 18 пар больной — потенциальный

HLA-гаплоидентичный родственный донор. ДНК выделяли из 200 мкл крови с антикоагулянтом ЭДТА при помощи станции для выделения ДНК NorDiag Arrow (Norway) в соответствии с рекомендациями производителя. Высокоразрешающее типирование гена HLA-DPB1 проводили методом PCR-SSP (ПЦР с сиквенс-специфическими праймерами) с использованием набора Olerup SSP (Швеция). Каждая пара донор-реципиент была классифицирована, как HLA-DPB1-совместимая, с допустимым несовпадением по HLA-DPB1, и с недопустимым несовпадением, согласно алгоритму (version 2.0), доступному на www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/dpb.html.

Результаты. Из 67 пар больной — HLA-идентичный родственный донор расхождение по одному из двух аллелей HLA-DPB1 наблюдалось у двух пар. У первом случае у больного с диагнозом «острый миелоидный лейкоз» алло-ТГСК была выполнена от донора-сестры. У больного на +140 день после алло-ТГСК произошло отторжение трансплантата. При типировании гена HLA-DPB1 выявлено несовпадение больной и донора по одному аллелю этого гена. Расклад HLA-гаплотипов позволил предположить наличие у донора рекомбинантной хромосомы: больная — а) A*03, B*50:01, C*06:02, DRB1*07:01, DQB1*02, DPB1*03:01 / с) A*24:02, B*39:06, C*07:02, DRB1*15:01, DQB1*06:02, DPB1*04:01;

брат — а) A*03, B*50:01, C*06:02, DRB1*07:01, DQB1*02, DPB1*03:01 / d) A*26, B*51, C*14, DRB1*11, DQB1*03, DPB1*02:01; сестра-донор — а) A*03, B*50:01, C*06:02, DRB1*07:01, DQB1*02, DPB1*03:01 / c-d)? A*24:02, B*39:06, C*07:02, DRB1*15:01, DQB1*06:02, DPB1*02:01. Во втором случае несовпадения по гену HLA-DPB1 донором больного с диагнозом «хронический миелолейкоз» являлась старшая сестра. У больного на +50 день после алло-ТГСК наблюдалось развитие острой РТПХ. Из-за отсутствия родителей установить природу несовпадения по гену HLA-DPB1 не представлялось возможным.

Из 18 пар больной — потенциальный HLA-гаплоидентичный родственник донор, типированных по гену HLA-DPB1, 17 пар совпали по одному из двух аллелей этого гена, у 14 пар определялось допустимое несовпадение по второму аллелю HLA-DPB1, у 3 пар — недопустимое. Один потенциальный донор

различался с больным по обоим аллелям HLA-DPB1.

Выводы. Хотя типирование гена HLA-DPB1 не входит в стандарты при алло-ТГСК, при селекции HLA-идентичного родственного донора следует учитывать возможное несовпадение больного и донора по этому гену. HLA-DPB1-генотипирование пар реципиент — HLA-идентичный родственник донор следует выполнять в тех случаях, когда не нужен эффект «трансплантат-против-лейкоза» и надо исключить возможное развитие РТПХ в посттрансплантационном периоде, например, у больных апластическими анемиями или некоторыми наследственными заболеваниями. Также проведение HLA-DPB1-генотипирования может быть показано при селекции HLA-гаплоидентичного родственного донора для исключения трансплантаций от доноров, несовпадающих с больным по обоим вариантам HLA-DPB1-аллелей.

Чернышов Д. С.¹, Кузьмина Е. П.², Абдрахимова А. Р.², Чапова Р. С.², Хамаганова Е. Г.²

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Челябинский государственный университет», Челябинск

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ДОНОРОВ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РЕГИСТРА ФГБУ «НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ» МИНЗДРАВА РОССИИ, САМООПРЕДЕЛИВШИХСЯ КАК ТАТАРЫ

Введение. Татары в России представлены тремя основными группами: поволжские, сибирские и крымские. Генетические исследования показали, что эти группы не имеют общих предков и их формирование происходило обособленно друг от друга. В Москве татары — третья по численности этническая группа — 149 043 (1,4 %).

Цель работы. установить распределение групп HLA-аллелей и HLA-гаплотипов у потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, самоопределившихся как татары.

Материалы и методы. Проведено HLA-генотипирование у 70 потенциальных доноров ГСК ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, определивших себя как татары. ДНК для исследования была выделена из 200 мкл крови с антикоагулянтом

ЭДТА с помощью станции для выделения ДНК NorDiagArrow(Norway). HLA-типирование проводили методом SSO, («Immucor Transplant Diagnostic, Inc.», USA) на анализаторе Luminex 200 по 5 локусам HLA-A-B-C-DRB1-DQB1. Частоту групп аллелей HLA-генов, гаплотипов и соответствие наблюдаемого распределения равновесию Харди-Вайнберга определяли с помощью программы Arlequin 3.5. Достоверность различий в частоте встречаемости генов определяли согласно критерию Пирсона. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты. У доноров ГСК регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как татары, среди групп аллелей HLA-A самыми высокочастотными оказались A*02 (32,14 %), A*03 (17,85 %), A*24 (10 %), A*26 (9,28 %) и A*01 (7,14 %). Выявлена тенденция на статистические различия по группе A*01

между донорами ФГБУ «НМИЦ гематологии» и татарами Челябинской области (ЧО) — 11,8 % и Татарстана — 10,98 % и по группе A*26 между донорами ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и татарами ЧО — 6,3 % и Татарстана — 4,4 %. В HLA-B самыми высокочастотными являлись группы аллелей В*07 (15 %), В*44 (11,4 %), В*13 (10,7 %), В*35 (9,2 %) и В*15 (5 %). Статистически значимых различий в частотах групп аллелей HLA-B между донорами «НМИЦ гематологии» и татарами ЧО и Татарстана не выявлено. В локусе HLA-C наиболее высокочастотными были группы С*07 (25,7 %), С*06 (17,14 %), С*04 (13,57 %), С*12 (12,14 %) и С*03 (10 %), что соответствовало данным по Татарстану, кроме значимых различий в частоте встречаемости С*02 — 1,42 % (доноры «НМИЦ гематологии») vs. 6,6 % (Татарстан), данные по ЧО отсутствуют. Среди групп аллелей HLA-DRB1 самыми высокочастотными у доноров «НМИЦ гематологии» оказались группы DRB1*07 (22,8 %), DRB1*01 (14,28 %), DRB1*15 (14,28 %), DRB1*13 (10,71 %), что не имеет различий с данными по Татарстану и ЧО. В локусе HLA-DQB1 наиболее высокочастотной группой являлась DQB1*03 (27,8 %), различий между донорами «НМИЦ гематологии» и татарами ЧО нет. Следовательно, различия между донорами «НМИЦ гематологии», которые самоопределились как татары, и татарами ЧО и Татарстана по частотам групп HLA-аллелей незначительны.

Больше различий выявлено между донорами ФГБУ «НМИЦ гематологии», самоопре-

делившимися как татары, и донорами, самоопределившимися как русские. Статистически значимые различия имелись по группам: HLA-B*18, В*46, В*58, HLA-C*02 и С*16. Среди групп аллелей локусов HLA класса II статистически значимые различия у доноров-татар и доноров-русских были по группам DRB1*09 (5,7 % и 0,9 % соответственно) и DRB1*11 (7,1 % и 13,2 % соответственно).

У доноров «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как татары, выявлено 16 пятилокусных HLA-гаплотипов с частотой встречаемости более 1 %, наиболее высокочастотными являлись: А*03-В*13-С*06-DRB1*07-DQB1*02 (2,85 %); А*01-В*08-С*07-DRB1*03-DQB1*02 (2,14 %); А*02-В*07-С*07-DRB1*15-DQB1*06 (2,14 %); А*30-В*13-С*06-DRB1*07-DQB1*02 (2,14 %), А*03-В*07-С*07-DRB1*13-DQB1*06 (2,14 %).

Выводы. Доноры ФГБУ «НМИЦ гематологии», самоопределившиеся как татары, по распределению групп HLA-аллелей и HLA-гаплотипов близки к татарам Татарстана и Челябинской области и отличаются от доноров регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как русские. Доноры-татары регистра «НМИЦ гематологии» являются представителями группы поволжских татар. Провести более точный анализ распределения групп HLA-аллелей и HLA-гаплотипов у доноров регистра «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как татары, позволит увеличение размера их выборки.

Шлегель Н. Ю., Степанов А. А., Каракальчева С. С., Косарев А. Н.

АУ «Югорский научно-исследовательский институт с банком стволовых клеток», Ханты-Мансийск

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ HLA У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ КОСТНОГО МОЗГА В ХАНТЫ-МАНСИЙСКОМ АВТОНОМНОМ ОКРУГЕ

Введение. Для аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток необходимо наличие HLA-совместимого донора. Даже при наличии кровных родственников вероятность найти HLA-идентичного сиблинга составляет только 25 %. Остальным пациентам производится поиск неродственных доноров в российских или зарубежных регистрах. Для пациентов, проживающих в наци-

ональных регионах России, успешность поиска может зависеть от наличия в регистрах доноров с уникальными генотипами. С целью увеличения успешности поиска доноров для пациентов Ханты-Мансийского автономного округа был создан региональный регистр. С другой стороны, доноры с редкими генотипами могут быть востребованы для пациентов, проживающих в других регионах России

и за границей. Поэтому для обеспечения глобального доступа результаты генотипирования вносятся в Национальный регистр доноров костного мозга.

Цель. Исследование особенностей частоты встречаемости HLA-аллелей у потенциальных доноров регистра Ханты-Мансийского автономного округа.

Материалы и методы. Проанализированы результаты HLA-генотипирования 95 образцов периферической крови. Образцы получены у кадровых доноров крови Отделения переливания крови Окружной клинической больницы г. Ханты-Мансийска, оформивших согласие стать потенциальными донорами костного мозга. Из 95 потенциальных доноров 43 мужчины и 52 женщины в возрасте от 22 до 55 лет (медиана 33 года). HLA-генотипирование выполнялось методом PCR SSP по трем локусам класса I (HLA-A, — B, — C) и по двум локусам класса II (HLA-DRB1, — DQB1). Выделение ДНК выполнялось методом колоночной фильтрации реагентами Protrans (Германия). Концентрация ДНК оценивалась на спектрофотометре. Для амплификации использовали наборы Protrans (Германия). Разделение продуктов амплификации проводилось методом электрофореза в агарозном геле.

Результаты. В локусе А определились 16 из 21 типизируемого варианта гена. Не обнаружены специфичности HLA-A: *36, *43, *69, *74, *89. Часто встречаемый в мире аллельный вариант гена HLA-A*02 также имел самую высокую частоту в настоящем исследовании — 0,258. Вторым по частоте встречаемости в локусе HLA-A у населения, проживающего на территории округа, определен *24 – 0,195. Далее по частоте встречаемости идут специфичности *03 – 0,142, *01 – 0,1, *25 – 0,042. Высокие частоты данных аллелей типичны для европеоидной популяции. Эти 5 аллельных вариантов обнаруживаются в 36,8 % случаев исследованной выборки. Наиболее

редкие варианты *29, *34, *66 имели минимальную частоту — 0,005.

В локусе В определились 25 из 37 типизируемых вариантов гена. Не обнаружены специфичности HLA-B: *13, *45, *46, *47, *55, *59, *67, *73, *78, *81, *82, *83. Наиболее распространен вариант гена *7, его частота составляет 0,132. Следующими по частоте встречаемости в локусе В являются аллели *35, *13, *18, *40 с частотой соответственно — 0,111, 0,095, 0,079 и 0,068. Наиболее редкие варианты *14, *42, *48, *49, *56 имеют минимальную частоту — 0,0052.

В локусе С с разной частотой обнаружены все исследуемые варианты гена, кроме HLA-C: *18. С частотой 0,258 значительно превалирует вариант HLA-C: *7. Следующими по частоте встречаемости в локусе С являются аллели *6, *12 с одинаковой частотой — 0,142. Наиболее редкие гены локуса HLA-C: *16 и *17 имели частоту 0,005.

В локусе DRB1 с разной частотой обнаружены все 13 исследуемых специфичностей. С частотой 0,174 превалирует DRB1*15. На втором месте по частоте встречаемости находится ген DRB1*07 – 0,163. По данным литературы достаточно высокая (около 0,20) частота DRB1*07 встречается у представителей Волго-Уральского региона — удмурты (0,231), татары (0,24), представителей центрально-сибирских популяций — буряты (0,26 и 0,13), и центрально-сибирской народности манси (0,17). В настоящем исследовании наиболее редкие гены локуса DRB1: *9, *10, *12, *14 имеют частоту < 0,026.

В локусе DQB1 с разной частотой обнаружены все 5 исследуемых специфичностей. Специфичности *6 и *3 встречались с частотой 0,3, *02 – 0,242, *5 – 0,105, *4 – 0,047.

Вывод. В результате исследования установлены частоты распределения HLA-аллелей у потенциальных доноров костного мозга, проживающих в Ханты-Мансийском автономном округе.

Янкевич Т.¹, Трофимов Ю. Д.^{1,2}, Болдырева М. Н.¹,
Шубина Е.², Гольцов А. Ю.², Алтухова О. С.², Сулова Т. А.³

¹ ООО «НПФ ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ»

² ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова МЗ РФ

³ Челябинская областная станция переливания крови

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ «HLA-ЭКСПЕРТ» ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ HLA С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ МЕТОДОМ NGS. ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ.

Введение. До появления технологий высокопроизводительного секвенирования (англ. Next Generation Sequencing, NGS) HLA-типирование больших массивов образцов с высоким уровнем разрешения для научных исследований или для подбора доноров гемопоэтических стволовых клеток было довольно трудоемким, малопроизводительным и дорогостоящим. Появление технологий NGS позволило не только увеличить производительность и скорость прочтения до миллиардов пар оснований, но и существенно снизить стоимость HLA-типирования.

Цель. Разработка системы для типирования HLA-генов с высоким разрешением методом NGS, включая оптимизированную методику приготовления библиотек для последующего высокопроизводительного секвенирования и программное обеспечение, позволяющее не только обсчитывать результаты секвенирования, но и проследить весь путь образца, начиная с момента регистрации пробы, через все этапы приготовления библиотеки, секвенирования и заканчивая экспортом результатов в различные базы данных.

Материалы и методы. Типирование генов HLA (A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DRB3/4/5) проводили с использованием праймеров собственного дизайна, собственных реагентов для приготовления библиотек фрагментов ДНК, технологии высокопроизводительного секвенирования Ion Torrent (S5, PGM) и разработанного авторами алгоритма анализа

данных. Всего было проанализировано 580 образцов по 9 генам HLA I и II класса.

Результаты. Были получены следующие результаты типирования:

- 450 образцов из собственных коллекций популяций русских из Архангельска, русских из Вологды, русских из Москвы, удмуртов (здоровый контроль и больные сахарным диабетом 1 типа), предварительно охарактеризованные с помощью наборов реагентов для типирования генов гистосовместимости человека (HLA) II класса методом амплификации ДНК (HLA-ДНК-ТЕХ) с низким разрешением. Результаты совпали.
- 100 образцов доноров первичной кроводачи Челябинской областной станции переливания крови, также предварительно охарактеризованные с низким разрешением. Результаты совпали.
- 30 образцов External Proficiency Testing SET2015, SET2016, SET2017. По результатам тестирования получены сертификаты.

Выводы. Разработана система «HLA-Эксперт» для типирования генов HLA с высоким разрешением методом NGS. Начата процедура регистрации набора в Росздравнадзоре. Система «HLA-Эксперт» может быть рекомендована для типирования генов HLA с высоким разрешением для проведения массовых научных исследований и типирования доноров для регистров стволовых клеток.

Абдрахимова А. Р.	19, 30, 51, 52, 53
Абдрахманова С. А.	39, 48
Алавердян А. И.	4, 24
Алтухова О. С.	56
Алянский А. Л.	31, 33
Ананьева А. В.	35
Афанасьев Б. В.	31, 33
Бакай В. В.	22
Балашова В. А.	20
Беляева Е. В.	22
Белянская Ю. В.	21, 38
Беркос А. С.	22, 44
Бессмельцев С. С.	20, 28, 43
Блау Игорь-Вольфганг	22
Блау Ольга Владимировна	23
Болдырева М. Н.	56
Бубнова Л. Н.	22, 44, 45
Буркитбаев Ж. К.	39, 48
Вавилов М. Н.	47
Васюков К. В.	51
Волкова О. Я.	21, 38
Волошин С. В.	20
Габидуллина Р. И.	35
Галибин О. В.	12
Гапонова Т. В.	51
Гольцов А. Ю.	56
Грицаев С. В.	20, 28, 43
Елсукова Л. В.	29
Енукашвили Н. И.	29, 43
Ермолина В. В.	31, 33
Ерохина Л. В.	22
Жернякова А. А.	28
Зайцева М. А.	36
Запреева И. М.	28
Заутер Ю.	27
Злотникова М. В.	26
Золина Т. Л.	29
Зорина Н. А.	37

Зубаровская Л. С.....	31, 33
Иванова Н. Е.	31, 33
Иоффе Ю. Г.....	27
Ищенко И. В.....	4, 24
Каракальчева С. С.....	54
Карпенко Ф. Н.	26
Кипяткова В. А.	27
Клементьева Н. А.	29
Клыценко О. А.	19
Ключников Д. Ю.	47
Косарев А. Н.....	54
Кострома И. И.....	28
Котова А. В.	29
Красильщиков А. М.....	27
Кудинова Э. Е.	4, 24
Кузьмина Л. А.	52
Кузьминова Е. П.....	19, 30, 51, 53
Кузьмич Е. В.	31, 33
Куликов С. М.....	40
Кутявина С. С.....	34
Лексина Я. А.....	35
Логинова М. А.	34, 36
Мерзлякова С. В.	31, 33
Минаева Н. В.	37
Моисеева Л. М.	22
Назарова Е. Л.....	37
Насрединова А. А.	31, 33
Нургалиев Д. Ж.....	48
Овчинникова Ю. Э.....	44, 45
Оспанова М. Е.....	48
Павлов А. Е.....	36
Парамонов И. В.	36, 37
Паровичникова Е. Н.	52
Пархоменко Т. В.....	19
Пильщикова Н. С.	36
Полякова А. П.	21, 38
Рамильева И. Р.....	39, 48
Расюк Е. Д.	26

АЛФАВИТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Рисинская Н. В.	40, 49
Ругаль В. И.	20, 43
Рябикина Е. В.	24, 4
Савченко В. Г.	51, 52
Савченко О. А.	4, 24
Семенова Н. Ю.	20, 28, 43
Семенов Г. В.	26, 42
Симакова Т. С.	36
Скакун В. Н.	29
Смирнова Д. Н.	34
Снежко И. В.	4, 24
Соколова Ю. В.	44
Старшинова А. А.	44, 45
Степанов А. А.	54
Судариков А. Б.	40, 49
Суслова Т. А.	47, 56
Сухорукова Э. Е.	37
Терентьева М. А.	22
Тиранова С. А.	28
Томсон В. В.	19
Трофимов Ю. Д.	56
Трусова Л. М.	47
Труфанова Т. И.	4, 24
Турганбекова А. А.	39, 48
Тюмина О. В.	47
Тяпушкина С. С.	31, 33
Урыбин И. Ю.	19
Февралева И. С.	49
Хамаганова Е. Г.	19, 30, 51, 53
Хоробрых М. Н.	37
Чабаева Ю. А.	40
Чапова Р. С.	51, 53
Черанев В. В.	34
Чернышов Д. С.	53
Чечеткин А. В.	28
Чубукина Ж. В.	20, 28
Чугреева Т. П.	51
Шагимарданова Е. И.	35

Шардаков В. И.	37
Шатохин Ю. В.	4, 24
Шлегель Н. Ю.	54
Шмидт А. Х.	27
Шубина Е.	56
Яблонский П. К.	44, 45
Янкевич Т.	56
Alaverdyan A. I.	4
Ishenkova I. V.	4
Kudinova E. E.	4
Ryabikina E. V.	4
Savchenko O. A.	4
Shatokhin Y. V.	4
Snezhko I. V.	4
Trufanova T. I.	4