

ИДЕНТИФИКАЦИЯ HLA-ФЕНОТИПА ЧЕЛОВЕКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

М.В. Торчило, магистрант

Научный руководитель – **А.В. Шашко**, к.сх.н., доцент

Полесский государственный университет

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения, одним из критериев определения эффективности здравоохранения страны является уровень развития в ней трансплантологии.

Успех проведенной трансплантации, как и органов, так и гемопоэтических стволовых клеток зависит от правильного подобранного донорского органа или стволовых клеток по HLA-системе [1, с.8].

Сейчас в мире стало возможным проведение сложнейших операций по пересадке жизненно важных органов. И ключевое значение в успешном осуществлении трансплантации имеет лабораторное исследование донора и реципиента – HLA-типирование пересаживаемых органов и тканей [2, с.74].

Серьезным фактором, ограничивающим применение аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, является отсутствие HLA-совместимого родственного донора. HLA-фенотип обязательно учитывается при подборе донора для трансплантации [3, с.212].

Цель работы: изучение особенностей различных молекулярно-генетических методов, используемых для определения HLA-фенотипов I и II класса.

Изучены 144 образца периферической крови человека при показаниях к трансплантации гемопоэтических стволовых клеток от донора.

Исследован образец крови больного (антикоагулянт – ЭДТА), который поступил по показаниям к проведению ТГСК молекулярно-генетическим методом HLA-генотипирования, у которого не было HLA-идентичного сиблинга, и сравнили его с 144 имеющимися образцами потенциальных неродственных доноров гемопоэтических стволовых клеток (ГСК),

Геномную ДНК получали с использованием наборов для ручного выделения ДНК в соответствии с рекомендациями производителя [4].

При проведении исследований применялся метод SSP (набор LERUP SSP, Stockholm).

SSP (метод специфических праймеров) – метод позволяет достаточно быстро произвести типирование, но могут быть ошибки. Также может потребоваться много анализов для получения точного генотипа [5].

Параллельно проводились исследования и на SSO: на платформе Luminex 200 (набор Immucor GTI Diagnostics, Inc. США); блот-гибридизация (набор INNO-LiPA HLA-A Amp Plus, Belgium) [6].

SSO (метод специфических олигонуклеотидов) – эти методы позволяют провести типирование достаточно быстро, но не со 100% точностью. Недостаток этих методов – невозможность точно типировать вариант с нуля. За один прием можно или определить HLA-тип в каких-то рамках, или уточнить тип на основании имеющихся данных. Для получения полного генотипа потребуется множество анализов. Метод SSO на платформе Luminex 200 представляет собой высокоэффективный подход [7].

Основным методом, используемым для HLA-типирования, является секвенирование нового поколения (NGS) от Illumina (набор NGSgo, Netherlands).

NGS (секвенирование) обеспечивает высокую производительность и точность. За один прогон можно проанализировать от 4 до 96 образцов по 11 локусам, до 192 образцов по 7 локусам или до 288 образцов по 5 локусам. Недостаток этого метода – дороговизна и продолжительность анализа [8].

Реципиент К., при исследовании методами SSP и SSO, являлся гомозиготой по специфичности HLA-A*02 (02:01:01:01-03/01:02-15/01:17-19/01:21/88N/94N-97,02:101:01/07/09/11/13N/14/16/18-21/23/25N/32-34/38/41/45/47 /50/51/53/57) и гетерозиготой по специфичности HLA-DRB1*04,13, но данные исследования дают информацию на уровне низкого разрешения.

Трактовать результаты больного на уровне высокого разрешения помогла NGS:

A*02:01:01, A*02:01:01

B*38:01:01:02, B*44:01:01

C*05:01:01, C*12:02:01

DRB1*04:01:01G, DRB1*13:01:01G

DQB1*02:01:01G, DQB1*06:03:01G

DPB1*04:01:01G, DPB1*04:01:01G

Совпадающий с больным по генам HLA-A/HLA-B/HLA-C/HLA-DRB1/DQB1/DPB1 оказался донор П.

Результаты HLA-типирования больного П.:

A*02:01:01, A*02:01:01

B*38:01:01:02, B*44:01:01

C*05:01:01, C*12:02:01

DRB1*04:01:01G, DRB1*13:01:01G

DQB1*02:01:01G, DQB1*06:03:01G

DPB1*04:01:01G, DPB1*04:01:01G

Так как фенотипы донора и реципиента совпали, вышеуказанные данные передаются в больницу.

Исходя из исследований 144 образцов выяснили методом SSP, что в локусе DRB1 наиболее часто встречаются аллельные группы 04 и 11. Методом блот-гибридизации SSO получили, что самыми распространенными в локусе А являются аллельные группы 02 и 24.

По полученным данным сделали вывод, что в локусе В часто встречается 44 аллельная группа, а наиболее часто 07 и 35.

По результатам полученных данных методом секвенирования нового поколения (NGS) от Illumina можно сказать, что в локусе А наиболее часто встречается 02 и 24, в локусе В – 7,35, в локусе С – 6,4, в локусе DRB1 – 4 и 11, в локусе DQB1 – 3, а в локусе DPB1 – 4 аллельные группы.

Установлено, что выбор между молекулярно-генетическими методами HLA-типирования зависит от конкретных потребностей исследования, доступности ресурсов и оборудования, а также от требуемой точности и разрешающей способности.

Список использованных источников

1. Климушева, Наталия Федоровна. Трансплантация солидных органов: пути оптимизации и повышения эффективности: автореферат дис. доктора медицинских наук: 14.01.24 / Климушева Наталия Федоровна; [Место защиты: Федер. науч. центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова]. – Москва, 2016. – 48 с.

2. Оприщенко С. А. Международные регулирующие документы и стандарты службы крови и производства препаратов плазмы / С. А. Оприщенко, В. В. Захаров, В. М. Русанов. – Москва : Медпрактика-М, 2018. – 464 с.; 21. – ISBN 978-5-98803-111-6.

3. Жибурт, Е. Б. Трансфузиология. Учебник / Е.Б. Жибурт. – Питер, 2012. – 736 с. – ISBN: 5-94723-281-2.

4. Ручной метод выделения ДНК с использованием набора реагентов «Нуклеосорб»: СОП 01.18.20. – Введ. 19.08.2024. – Минск: РНПЦ ТиМБ, 2024. – 7 с.

5. Молекулярное HLA-типирование образцов крови методом SSP: СОП 04-2023 – Введ. 20.11.2023. – Минск: РНПЦ ТиМБ, 2023. – 9 с.

6. HLA-генотипирование SSO технология (блот-гибридизация): СОП 07-2023 – Введ. 20.11.2023. – Минск: РНПЦ ТиМБ, 2023. – 12 с.

7. HLA-генотипирование (метод SSO на платформе Luminex 200): СОП 05-2023 – Введ. 20.11.2023. – Минск: РНПЦ ТиМБ, 2023. – 13 с.

8. HLA-генотипирование (методом секвенирования нового поколения (NGS) от Illumina): СОП 01.18.12 – Введ. 13.06.2024. – Минск: РНПЦ ТиМБ, 2023. – 37 с.

9. Новик А. А. (д-р мед. наук) Генетика в клинической медицине [Рук. для врачей] / А. А. Новик, Т. А. Камилова, В. Н. Цыган; Воен.-мед. акад.. – СПб. : ВМА, 2001. – 219 с. ил.; 22. – (Серия «Медицина XXI века»); ISBN 5-94277-006-9.