

Научные исследования на базе регистра доноров ГСК



Л.Н. Бубнова, И.Е. Павлова, Т.В. Глазанова, М.А. Терентьева
Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России

Донецк, 2021



Роль регистров

-
- Регистр – организация, которая способна координировать поиск гемопоэтических стволовых клеток от неродственного донора (включая пуповинную кровь) для потенциального реципиента
- Регистр создает и поддерживает базы данных неродственных взрослых доноров, типированных по генам системы HLA;
- обеспечивает связи между донорскими центрами, центрами сбора ГСК и трансплантационными центрами на национальном и международном уровнях;
- проводит поиск донора;
- координирует подтверждающее типирование, получение и транспортировку ГСК.

Регистр прежде всего – это база данных для поиска донора – практическая цель, но, кроме того, может быть использован для выполнения ряда научных задач:

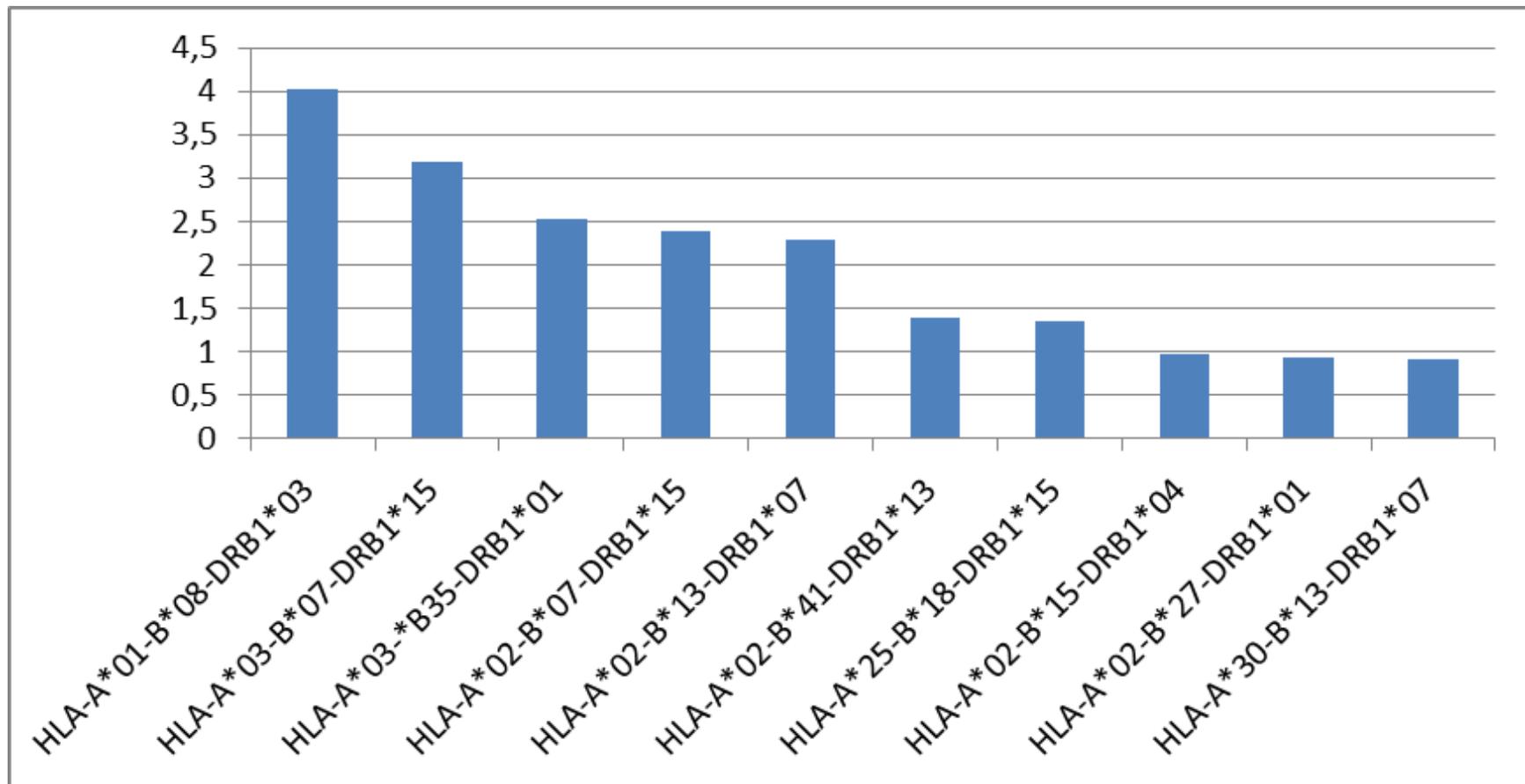
- Изучение иммуногенетических характеристик жителей различных регионов России;
- Сравнительное изучение генетического профиля жителей России и зарубежных стран;
- В качестве объекта при изучении пандемии, вызванной COVID-19

Изучение иммуногенетических характеристик и их особенностей у жителей различных регионов РФ

Российская Федерация:
площадь более 17 млн кв. км, население около 140 млн,
проживает около 200 национальностей



При анализе трехлокусных гаплотипов 1456 потенциальных доноров ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России выявлено 770 различных HLA-A*-B*-DRB1* вариантов. В **первые десять** наиболее распространенных вошли сочетания, частота которых варьировала от 4,03% до 0,92%.



Мы ранжировали гаплотипы в зависимости от частоты их встречаемости в С-Пб – первые 10 наиболее часто встретившихся, и сравнили с также наиболее частыми в других регионах. Значками # обозначено отсутствие таких гаплотипов в числе десяти наиболее частых в этих городах.

Как показало сравнение (рис. 7), наибольшее сходство обнаружено у жителей С-Пб и Н. Новгорода, что подтверждается тем, что для реципиентов-жителей С-Пб достаточно часто обнаруживаются совместимые доноры из Н.Новгорода. И наименьшее сходство генетических характеристик у доноров С-Пб и Ростова-на-Дону и Первоуральска.

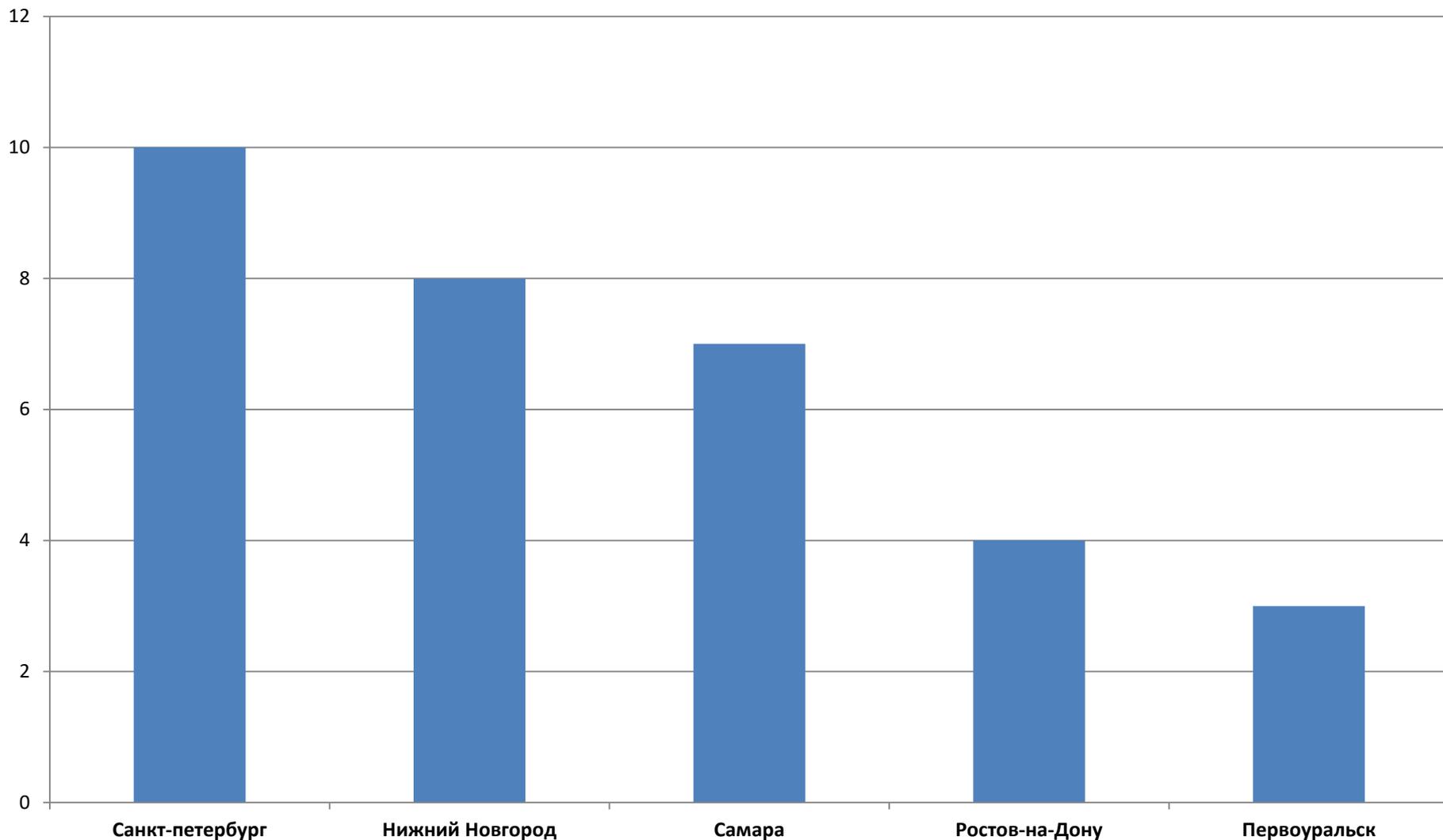
**Частота трехлокусных гаплотипов HLA-A-B-DRB1*
у потенциальных доноров ГСК из Санкт-Петербурга,
Нижнего Новгорода, Самары, Ростова, и Первоуральска**

Гаплотип	Частота (%) Санкт-Петербург	Частота (%) Нижний Новгород	Частота (%) Самара	Частота (%) Ростов	Частота (%) Первоуральск
A*01 B*08 DRB1*03	4,03	3,5	3,9	4,6	2,1
A*03 B*07 DRB1*15	3,18	3,4	3,8	1,8	#
A*03 B*35 DRB1*01	2,53	3,7	1,9	#	#
A*02 B*07 DRB1*15	2,39	2,2	#	1,8	3,5
A*02 B*13 DRB1*07	2,28	2,1	2,6	2,5	#
A*02 B*41 DRB1*13	1,39	#	#	#	#
A*25 B*18 DRB1*15	1,35	1,5	#	#	#
A*02 B*15 DRB1*04	0,97	1,4	2,0	#	#
A*02 B*27 DRB1*01	0,94	1,6	1,3	#	2,1
A*30 B*13 DRB1*07	0,92	#	1,5	#	#

Число совпадающих трехлокусных гаплотипов

HLA-A-B-DRB1*

у потенциальных доноров ГСК – жителей разных городов
(по сравнению с десятью наиболее распространенными в С-Пб)



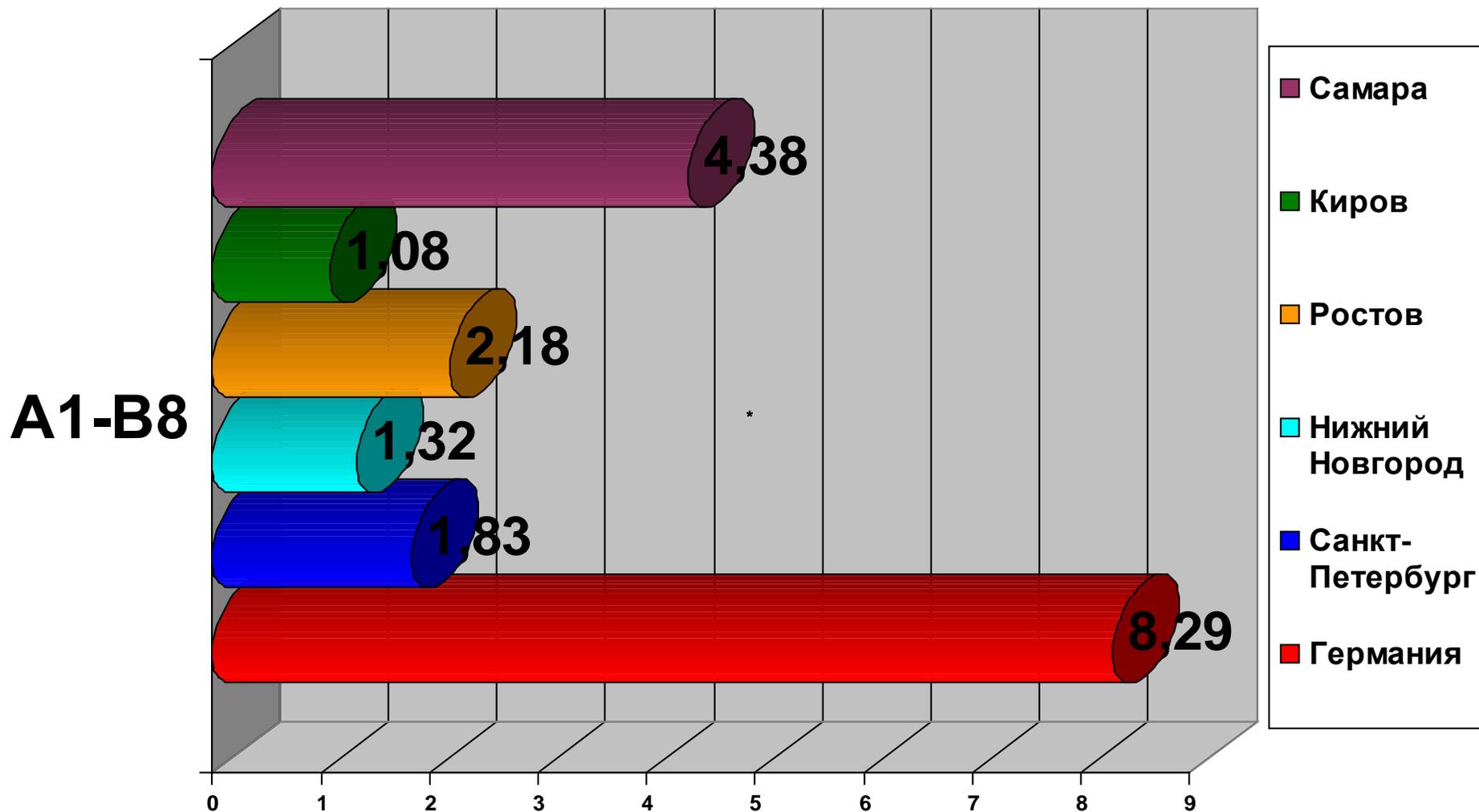
Сравнение иммуногенетических
особенностей жителей РФ и
зарубежных стран

Сравнение иммуногенетических особенностей жителей РФ и зарубежных стран проводилось в течение нескольких десятилетий, когда мы доказывали необходимость организации собственного Российского регистра доноров костного мозга/гемопоэтических стволовых клеток.

Проведенные более 20 лет назад серологическим методом исследования уже показали, что различия между жителями Германии и регионов РФ более значимы, чем иммуногенетические различия жителей разных регионов между собой (рис. 11).

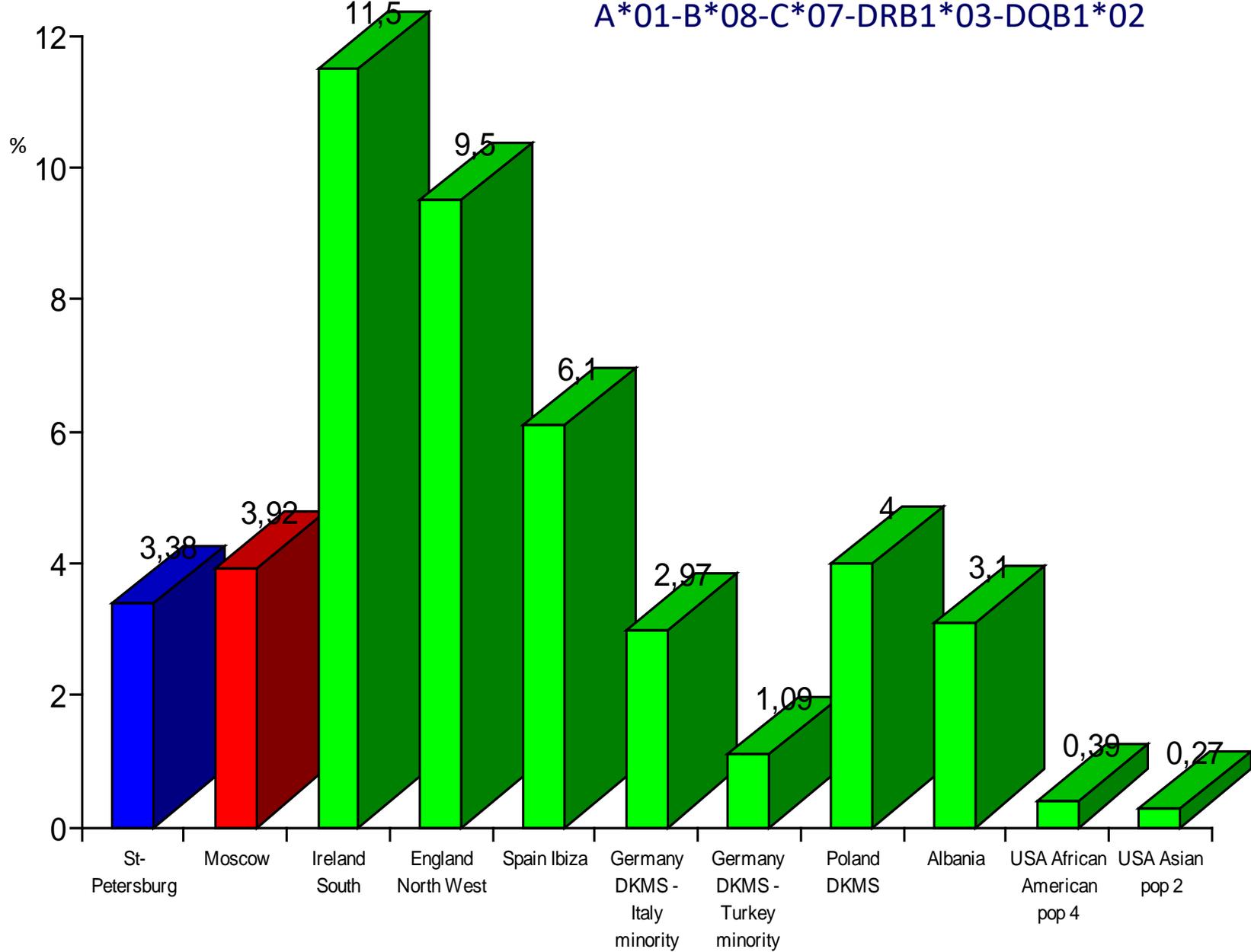
Исследования, выполненные позднее молекулярным методом (рис. 12), подтвердили это.

Ранжирование по гаплотипу A1-B8

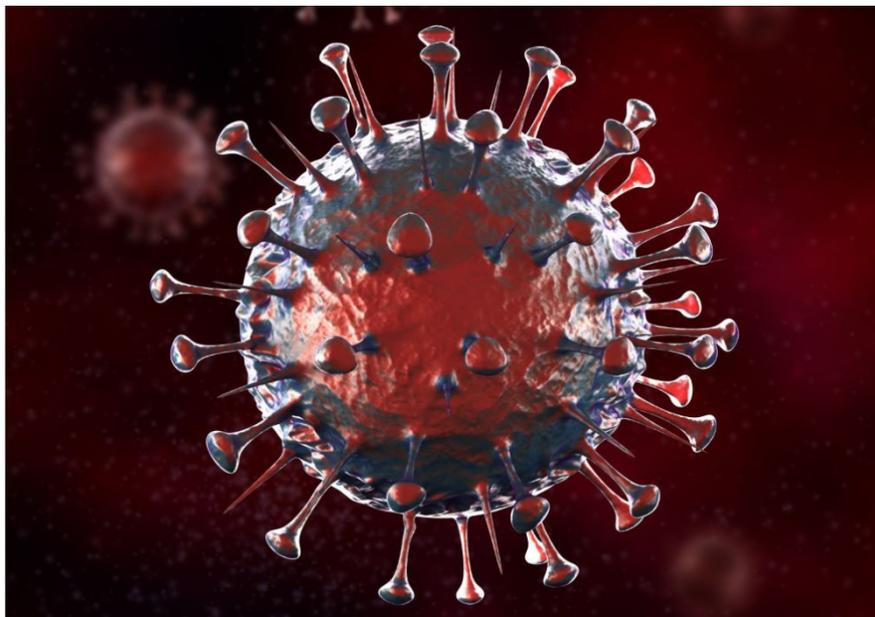


Similarities

A*01-B*08-C*07-DRB1*03-DQB1*02



ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГРУПП АЛЛЕЛЕЙ HLA-A*, B*, DRB1* СРЕДИ ЛИЦ, ПЕРЕНЕСШИХ COVID-19



ПРОФИЛАКТИКА КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

ЧАЩЕ МОЙТЕ РУКИ
с дезинфицирующими
средствами



ИСПОЛЬЗУЙТЕ МАСКУ,
при необходимости



ИЗБЕГАЙТЕ БЛИЗКИХ КОНТАКТОВ
С ДРУГИМИ ЛЮДЬМИ



ОБРАТИТЕСЬ ЗА
МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩЬЮ
при необходимости



УКРЕПЛЯЙТЕ ИММУНИТЕТ



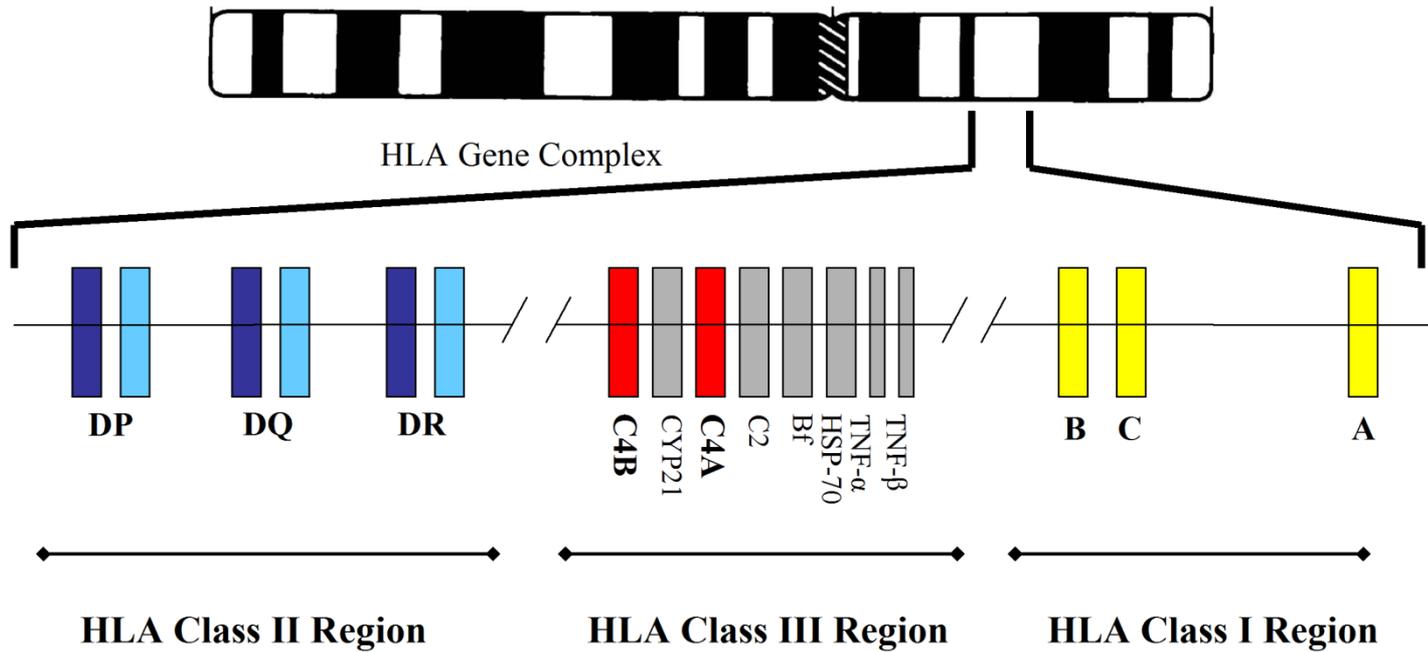
ОСТАВАЙТЕСЬ ДОМА,
если чувствуете недомогание



Пандемия COVID-19 привела к уникальной ситуации, когда ученые различных специальностей сосредоточили свое внимание как на изучении самого вируса и путей его проникновения в организм человека, так и на изучении иммунных механизмов, влияющих на развитие этой инфекции, и генетических факторов, которые влияют на восприимчивость или защиту от тяжелых проявлений заболевания.

Одним из важнейших генетических факторов в ответе на инфекцию является главный комплекс гистосовместимости человека – система HLA (Human Leukocyte Antigens). Ключевая роль, которую молекулы HLA играют в иммунном ответе, презентирруя пептиды патогенов, и огромная молекулярная вариабельность аллелей HLA в человеческих популяциях, стали основанием для проведения многочисленных исследований, направленных на изучение роли HLA-генотипов в индивидуальных особенностях ответа на инфекцию, вызванную β -коронавирусом SARS-CoV-2.

Chromosome 6

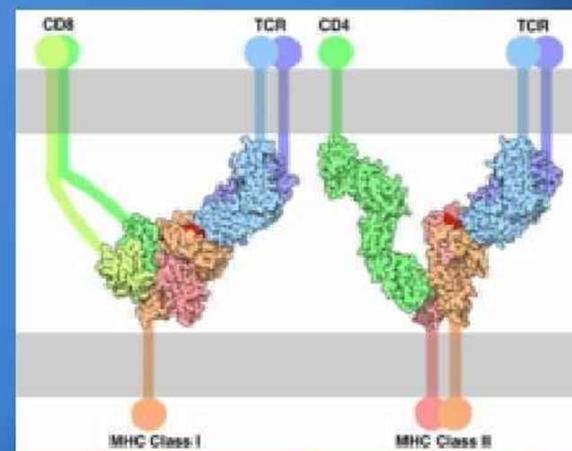


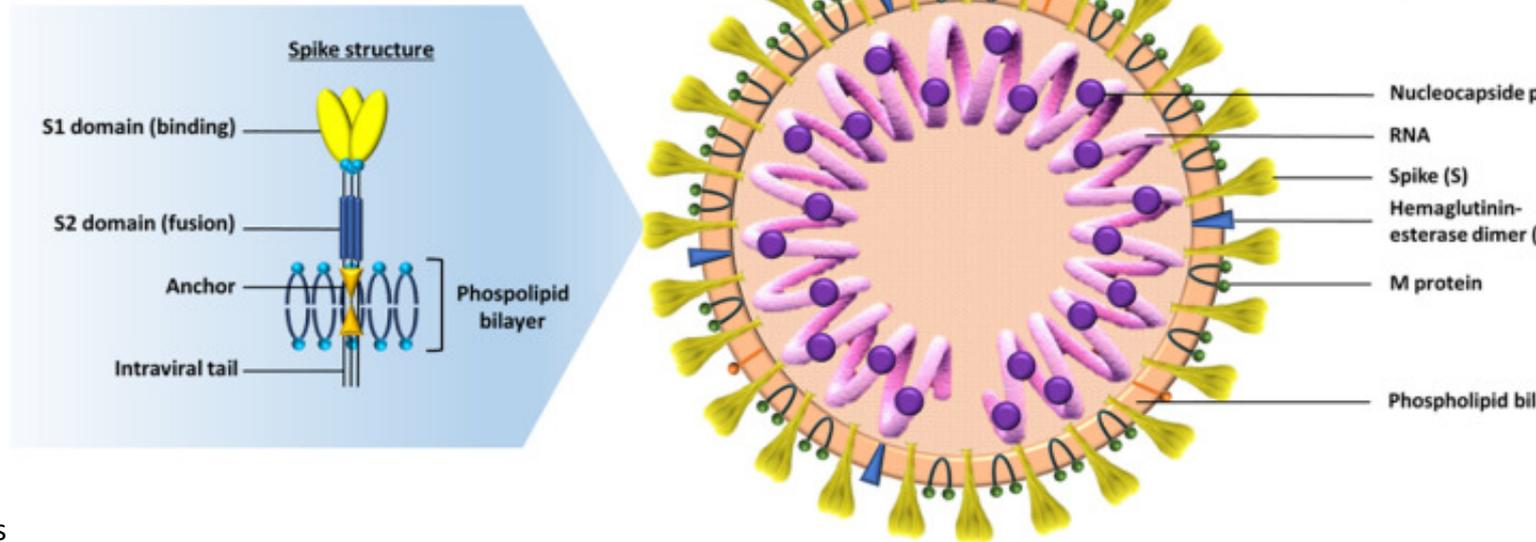
- Самая высокополиморфная генетическая система человека
- Состоит из генов, имеющих **решающее значение для инициации, регуляции и реализации иммунного ответа**
- Установлена связь с различными группами заболеваний: аутоиммунными, инфекционными (вызванными бактериями, вирусами), онкологическими и другими с некоторыми общими характеристиками
- Для одного заболевания могут быть разные ассоциации в конкретных этнических группах населения

Значительное число исследований основано на биоинформативном подходе, который строится на прогнозировании представления различными аллельными вариантами HLA класса I количества процессированных вирусных пептидов.

Эти исследования исходят из предпосылки, что чем больше способность презентации вирусных частиц клетками определенного HLA-генотипа, тем более выражен иммунный ответ, опосредованный цитотоксическими Т-клетками.

Главный комплекс гистосовместимости HLA





Possible role of HLA clas

[Ignacio Iturrieta-Zuazo](#)^{a,1}, [Claudia Geraldine Rita](#)^a, [Ana García-Soidán](#)^a, [Ana de Malet Pintos-Fonseca](#)^d, [Nieves Alonso-Alarcón](#)^a, [Roberto Pariente-Rodríguez](#)^a, [Amalia Tejeda-Velarde](#)^a, [Sergio Serrano-Villar](#)^c, [José Luis Castañer-Alabau](#)^a and [Israel Nieto-Gañán](#)^{a,*}

Анализ между супертипами HLA и пептидным средством SARS-CoV-2 показывает, что супертипы **A2** теоретически распознают значительно больше пептидов, чем супертипы **A1** и **A3** ($p < 0,0001$), как для слабого, так и для сильного средства. Кроме того, супертип **C1** демонстрирует теоретически более высокое распознавание вирусного пептида для аффинности слабого ($p = 0,031$) и сильного ($p = 0,016$) связывания. Для супертипов **B** различий не обнаружено.

Это исследование устанавливает **взаимосвязь** между большим количеством распознаваемых пептидов и лучшей клинической эволюцией при сравнении пациентов легкой группы, которой не требовалась госпитализация, с другими пациентами.

Результаты исследований связи HLA с восприимчивостью к заболеванию, характеру течения и исходу

Устойчивость к заболеванию	Восприимчивость к заболеванию	Тяжелая форма	Смертность
HLA-A * 02: 02 HLA-B * 15: 03 HLA-C * 12: 03 (биоинформ., Nguyen A. et al.)	HLA-A * 25: 01 HLA-B * 46: 01 HLA-C * 01: 02 (биоинформ., Nguyen A. et al.)		HLA-A * 11 HLA-C * 01 HLA-DQB1 * 04 (Испания)
HLA - A2, C1 (Испания)	HLA-A1, HLA-A3 (Испания)	DRB1 * 15:01, DQB1 * 06:02, B * 27: 07 (Испания)	
HLA-B*27:05, HLA-DQB1*05:01, HLA-DPB1*10:01 (Китай)	HLA-B * 46: 01 (Китай)	HLA-B * 46: 01 (Китай)	
	HLA-A * 24: 02 DPA1 * 02: 02 DPB1 * 05: 01 (Китай, Ухань)		
	HLA B * 07:03 HLA-DRB1 * 03:01 (Гонконг)		
HLA-A * 11: 01 HLA-A * 24: 02 (Япония)	HLA-A * 02: 01 (Япония)		
HLA-A*02:05, B*58:01, C*07:01, DRB1*03:01 (Сардиния)		HLA-DRB1 * 08: 01	
HLA-A * 02.01., B * 18.01, C * 07.01, DRB1 * 11.04 (Италия)	HLA-A *: 01: 01, B * 08: 01, C * 07: 01, DRB1 * 03: 01 (Италия)		HLA-A *: 01: 01, B * 08: 01, C * 07: 01, DRB1 * 03: 01 (Италия)

Ряд исследований сосредоточен на обнаружении конкретных аллелей восприимчивости или устойчивости к заболеванию, вызванному COVID-19. Уже показаны отдельные закономерности, однако они могут быть как универсальными для нескольких популяций, так и специфическими, поскольку распределение HLA-генов различается у разных народов, складываясь в зависимости от условий существования, в том числе для защиты от окружающих патогенов.

В связи с этим понятно, что изучение взаимосвязи индивидуального HLA-генотипа и возникновения и/или характера течения SARS-CoV-2 инфекции должно выполняться в сравнении с распределением генов HLA среди жителей соответствующего региона.

Выполненные нами исследования базируются на данных о донорах нашего регистра.

Объект и методы исследования

Все лица, включенные в исследование, являлись жителями Северо-западного региона РФ (г. Санкт-Петербург).

Перенесших новую коронавирусную инфекцию – COVID-19, - **138** человек, которые являлись потенциальными донорами гемопоэтических стволовых клеток регистра Рос НИИГТ ФМБА России.

Заболевание было подтверждено, в соответствии с клинико-лабораторными исследованиями, регистрацией в Системе автоматизированного учета инфекционных и паразитарных заболеваний в Санкт-Петербурге "САУ "Инфекция" (рег. № 2008615797 от 04.12.2008г.) с получением эпидномера.

- Среди 138 переболевших мужчин 61 (44,2%), женщин 77 (55,8%), в возрасте от 20 до 65 лет (группа 1).
- Группу популяционного контроля составили 1456 здоровых лиц в возрасте от 20 до 60 лет (мужчин 871 – 59,8%, женщин 585 – 40,2%), (группа 2).

Методы исследования

- Иммуногенетическое обследование (HLA-типирование) проводилось в соответствии с международными стандартами (EFI) с использованием молекулярно-генетических методов типирования.
- Геномную ДНК выделяли из ядросодержащих клеток периферической крови с использованием набора реагентов DNA BOX 500 (Protrans). Оценка количества и качества выделенной ДНК осуществлялась с помощью метода спектрофотометрии (спектрофотометр Smartspec Plus.). Качество выделенной ДНК оценивалось по соотношению оптических плотностей при длинах волн 260/280 nm. Конечная концентрация выделенной ДНК составляла 25-35 нг/мкл. Нормативный диапазон соотношения оптических плотностей – 1,6-1,8.
- HLA-типирование проводили на уровне базового разрешения, (определение групп аллелей HLA-генов локусов A, B, DRB1) с помощью полимеразной цепной реакции с сиквенс-специфичными праймерами (PCR-SSP) производства “Protrans” (Германия) и с помощью полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными сиквенс-специфичными пробами (PCR-SSOP) производства BAG HEALTH CARE (Германия). Визуализация продуктов, полученных в результате PCR-SSP, выполнялась с помощью электрофореза в 2% агарозном геле. Интерпретация результатов осуществлялась с помощью таблиц, прилагаемых к набору праймеров.
- Процедура гибридизации для проведения PCR-SSOP осуществлялась в полностью автоматическом режиме с помощью прибора Mr SPOT. Учет результатов реакции и интерпретация полученных результатов осуществлялись с помощью программного обеспечения HISTO MATCH.

- Оба использованных метода HLA-типирования позволяли выявить **21** группу аллелей локуса HLA-A (*01, *02, *03, *11, *23, *24, *25, *26, *29, *30, *31, *32, *33, *34, *36, *43, *66, *68, *69, *74, *80);
- **36** групп аллелей локуса HLA-B (*07, *08, *13, *14, *15, *18, *27, *35, *37, *38, *39, *40, *41, *42, *44, *45, *46, *47, *48, *49, *50, *51, *52, *53, *54, *55, *56, *57, *58, *59, *67, *73, *78, *81, *82, *83);
- **13** групп аллелей локуса HLA-DRB1 (*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15, *16).
- Статистическую обработку результатов выполняли с помощью методов популяционной генетики с использованием программ: Microsatellite Tools for Excel и Arlequin 3.5.1.3 (<http://www.allelefrequencies.net>).

На рис. 25 представлено, что среди лиц, перенесших новую коронавирусную инфекцию, вызванную вирусом COVID-19, оказалась значимо сниженной частота группы аллелей HLA-A*02 - 39,86% по сравнению с контрольной группой - 51,72%, $\chi^2=7,58$.

Также значимо снижена и частота группы аллелей HLA-A*26 – 4,35 % по сравнению с 9,07 %, $\chi^2=4,17$.

Более чем в 2 раза увеличена частота HLA-A*29 - 5,80 % у перенесших COVID-19, и 2,47 % в контрольной группе, $\chi^2=4,03$.

Это позволяет считать, что группы аллелей HLA-A*02 и HLA-A*26 ассоциированы со сниженным риском развития заболевания, в то время как HLA-A*29, ассоциирован с высоким риском заболевания.

Частота групп аллелей HLA-A* у лиц, перенесших COVID-19,
по сравнению с популяционным контролем

Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в контроле (%) n=1456	Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в контроле (%) n=1456	Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в контроле (%) n=1456
HLA-A*01	23,91	21,57	HLA-A*26	4,35 $\chi^2=4,17$	9,07	HLA-A*36	0,00	0,07
HLA-A*02	39,86	51,72 $\chi^2=7,58$	HLA-A*29	5,80 $\chi^2=4,03$	2,47	HLA-A*43	0,00	0,00
HLA-A*03	34,78	27,47	HLA-A*30	5,80	3,71	HLA-A*66	0,00	1,24
HLA-A*11	14,49	10,44	HLA-A*31	1,45	3,43	HLA-A*68	1,45	7,42
HLA-A*23	2,17	4,19	HLA-A*32	6,52	3,85	HLA-A*69	10,14	0,21
HLA-A*24	21,01	19,85	HLA-A*33	2,90	3,57	HLA-A*74	0,00	0,00
HLA-A*25	10,14	9,48	HLA-A*34	0,00	0,00	HLA-A*80	0,00	0,00

В локусе В (рис. 27) значимых различий в сравниваемых группах не установлено.

В локусе HLA-DRB1 (рис. 28) также отсутствуют какие-либо значимые различия частот групп HLA аллелей у лиц, перенесших COVID-19, по сравнению с контролем.

**Частота групп аллелей HLA-B* у лиц, перенесших COVID-19,
по сравнению с популяционным контролем**

Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в группе 2 (%) n=1456	Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в группе 2 (%) n=1456	Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в группе 2 (%) n=1456
HLA-B*07	21,01	25,89	HLA-B*41	3,62	5,56	HLA-B*54	0,72	0,14
HLA-B*08	11,59	12,43	HLA-B*42	0,00	0,21	HLA-B*55	1,45	2,61
HLA-B*13	8,70	12,02	HLA-B*44	13,77	18,54	HLA-B*56	2,90	2,34
HLA-B*14	2,17	3,91	HLA-B*45	0,00	0,34	HLA-B*57	5,80	5,43
HLA-B*15	10,87	12,29	HLA-B*46	0,72	0,21	HLA-B*58	2,90	2,06
HLA-B*18	9,42	13,67	HLA-B*47	0,00	0,27	HLA-B*59	0,00	0,07
HLA-B*27	6,52	10,10	HLA-B*48	0,00	0,96	HLA-B*67	0,00	0,07
HLA-B*35	16,67	20,88	HLA-B*49	1,45	2,34	HLA-B*73	0,00	0,14
HLA-B*37	1,45	1,92	HLA-B*50	2,90	1,30	HLA-B*78	0,00	0,00
HLA-B*38	9,42	7,21	HLA-B*51	7,97	9,20	HLA-B*81	0,00	0,07
HLA-B*39	3,62	4,81	HLA-B*52	2,90	4,05	HLA-B*82	0,00	0,00
HLA-B*40	7,97	11,47	HLA-B*53	0,00	0,07	HLA-B*83	0,00	0,00

Частота групп аллелей HLA-DRB1* у лиц, перенесших COVID-19,
по сравнению с популяционным контролем

Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в контроле (%) n=1456	Группа аллелей	Частота в группе 1 (%) n=138	Частота в контроле (%) n=1456
HLA-DRB1*01	24,64	23,70	HLA-DRB1*11	18,84	22,94
HLA-DRB1*03	21,01	16,28	HLA-DRB1*12	2,90	3,85
HLA-DRB1*04	21,74	20,40	HLA-DRB1*13	26,81	25,00
HLA-DRB1*07	26,09	25,69	HLA-DRB1*14	2,90	3,16
HLA-DRB1*08	4,35	5,91	HLA-DRB1*15	26,09	28,37
HLA-DRB1*09	2,90	2,47	HLA-DRB1*16	7,25	8,65
HLA-DRB1*10	0,00	1,79	-	-	-

При анализе трехлокусных гаплотипов HLA-A*-B*-DRB1* в группе перенесших COVID-19 (рис. 30), установлено, что гаплотипы, включающие группу HLA-аллелей A*02, реже встречаются у лиц, перенесших COVID-19, что подтверждает протективную роль группы аллелей A2.

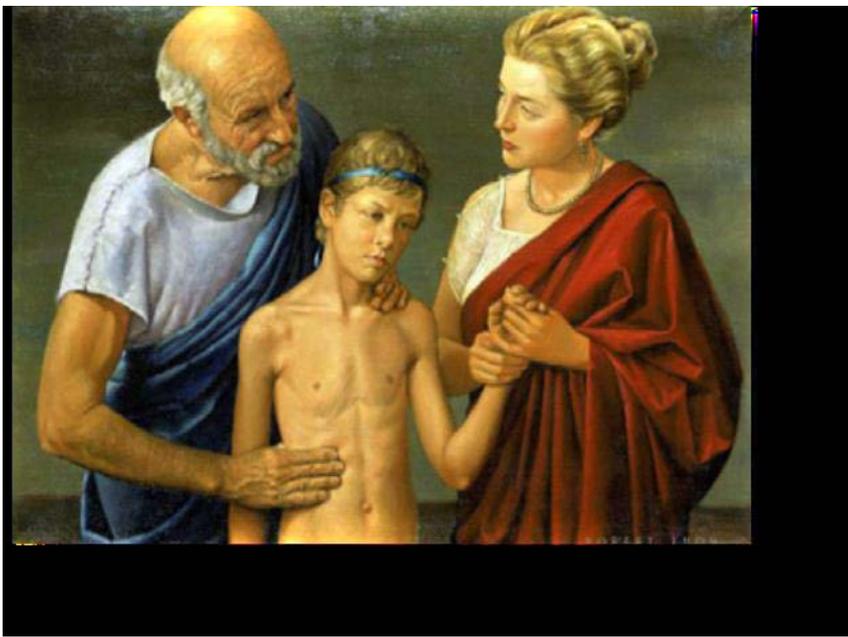
Частота десяти наиболее частых трехлокусных гаплотипов HLA-A*-B*-DRB1* у лиц, перенесших COVID-19, по сравнению с популяционным контролем

Частота в группе перенесших COVID-19 (n=138)

Частота в контроле (n=1456)

HLA-A*-B*-DRB1* гаплотип	Частота (%)
A*01 B*08 DRB1*03	4,7
A*03 B*07 DRB1*15	4,3
A*03 B*35 DRB1*01	2,9
A*02 B*13 DRB1*07	2,2 4
A*24 B*07 DRB1*15	2,2
A*25 B*18 DRB1*15	1,8
A*02 B*07 DRB1*15	1,8 7
A*03 B*38 DRB1*13	1,4
A*25 B*18 DRB1*15	1,4
A*02 B*44 DRB1*04	1,4 10

HLA-A*-B*-DRB1* гаплотип	Частота (%)
A*01 B*08 DRB1*03	4,3
A*03 B*07 DRB1*15	2,5
A*02 B*13 DRB1*07	2,5 3
A*02 B*07 DRB1*15	2,3 4
A*03 B*35 DRB1*01	1,9
A*25 B*18 DRB1*15	1,6
A*02 B*15 DRB1*04	1,1 7
A*02 B*41 DRB1*13	1,1 8
A*30 B*13 DRB1*07	1,1
A*24 B*07 DRB1*15	0,9



**«Предпочтительнее знать тип человека, пораженного болезнью, чем тип болезни, которая поражает человека»
Гиппократ, IV век до н.э**

Наличие групп HLA-аллелей A*02 и A*26 в генотипе снижает вероятность заболевания, в то время как присутствие HLA-A*29 может служить фактором, предрасполагающим к развитию заболевания.

Сравнение частот трехлокусных гаплотипов также подтвердило значимость наличия в генотипе HLA-аллелей группы A*02: так, среди лиц, пересших COVID-19, обнаружено меньше гаплотипов с такими аллелями.

Продолжение работы

- 1. Изучение особенностей распределения HLA-A*, B*, DRB1* среди лиц, перенесших covid-19, на аллельном уровне
- 2. Расширение спектра определяемых специфичностей
- 3. Изучение особенностей распределения HLA-специфичностей у лиц, перенесших заболевание, вызванное «индийским» штаммом (вариант «Дельта»)
- 4. Изучение распределения HLA-специфичностей у лиц, повторно перенесших заболевание, вызванное covid-19



Благодарности

Кафедра иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Санкт-Петербургу, Санкт-Петербург, Россия

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург», Санкт-Петербург, Россия

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Благодарю за внимание!

