

Ж.К. Буркитбаев<sup>1</sup>, С.А. Абдрахманова<sup>1</sup>, И.Р. Рамильева<sup>1</sup>,  
А.А. Турганбекова<sup>1</sup>, Д.К. Баймукашева<sup>1</sup>, Е.Б. Жибурт<sup>2</sup>

<sup>1</sup>РГП на ПХВ «Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства здравоохранения  
Республики Казахстан, 010000, г. Астана, Казахстан

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕНОВ ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ. ВЫЯВЛЕНИЕ НОВОГО АЛЛЕЛЯ HLA-DQB1\*03:82

В статье представлено описание нового аллельного варианта гена HLA-DQB1, впервые выявленного в Республике Казахстан. В Научно-производственном центре трансфузиологии г. Астана в 2011 - 2015 гг. было обследовано 3501 потенциальных доноров Национального регистра гемопоэтических стволовых клетки 936 пациентов с онкогематологическими заболеваниями (в возрасте от 0-66 лет). Методом аллельспецифического секвенирования у казахстанского онкогематологического пациента с диагнозом острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) выявлен новый аллельный вариант HLAII класса локуса DQB1\*03:82. Новый аллель похож на уже ранее известный аллель HLA-DQB1\*03:01, отличается заменой в кодоне 223 (TGC>TAC), приводящей к замене аденина на гуанин в 223 пептидсвязывающей бороздке. Показано, что аллель является наследуемым, а не возникшим в результате мутации при ОМЛ.

**Ключевые слова:** распределения и специфичность HLA; новый аллельный вариант, HLA-DQB1\*03:82.

**Введение:** Определение гистосовместимости у пар «донор-реципиент» играет большую роль в приживлении трансплантата. По мере накопления хирургического опыта по трансплантациям и совершенствования качества Humanleukocyteantigen (HLA) типирования стало ясным, что выживаемость пересаженного органа, несомненно, связано со степенью HLA-несовместимости. Поэтому сейчас во всех трансплантологических центрах не делают пересадку «вслепую», обязательно определяют степень HLA-совместимости у пар «донор-реципиент». Многократно доказано, что, чем меньше различий между HLA-антигенами донора и реципиента, тем успешней в конечном итоге результат, тем выше выживаемость трансплантатов [1].

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) с иммунологических позиций наиболее сложный вид пересадок, поскольку пересаживается иммунокомпетентная ткань, и в случае ее приживления иммунологический конфликт развивается в двух направлениях: «хозяин против трансплантата» и «трансплантат против хозяина» [2-3]. Поэтому основным условием для ТГСК является HLA-идентичность между донором и реципиентом. Наиболее эффективным донором при ТГСК является однойцевый близнец или идентичный с больным по всем антигенам 5-ти локуса HLA-системы сиблинг, обследованный на высокоразрешающем типировании [4-5].

Сейчас проведение сложнейших операций по пересадке жизненно важных органов стало возможным в Казахстане. И ключевое значение в успешном осуществлении трансплантации имеет лабораторное исследование совместимости донора и пациента, так называемое HLA-типирование пересаживаемых органов и тканей. Эти исследования на протяжении уже без малого пяти лет в Казахстане осуществляет первая и уникальная на сегодня лаборатория иммунологического типирования тканей – HLA-лаборатория службы крови, созданная в 2010 году на базе Научно-производственного центра трансфузиологии (НПЦТ). С 2011 года отделение HLA-лаборатории НПЦТ согласно приказа Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 928 от 27 декабря 2011 года «О некоторых вопросах трансплантации тканей и (или) органов (части органов)» была определена базой лабораторного сопровождения процесса трансплантации в Республике Казахстан. Лабораторией проводятся как серологические, так и молекулярно-генетические виды исследования антигенов системы HLA. Все виды серологических исследований основаны на микролимфоцитотоксическом тесте.

Типирование, основанное на анализе ДНК, имеет несколько преимуществ по сравнению с серологическими методами: высокая чувствительность и специфичность, небольшие объемы проб, отсутствие необходимости использовать живые клетки и наличие антигенов на поверхности клетки. Также анализ ДНК дает возможность определить намного больше аллельных вариантов антигенов HLA-системы. В последнее десятилетие широко применяется секвенирование ДНК, то есть, определение нуклеиновой последовательности определенного участка хромосомы. В нашем случае, для изучения антигенов системы HLA, исследуется последовательность нуклеотидов, расположенных на коротком плече 6-ой хромосомы. Широкое применение метода секвенирования ДНК дала возможность открытия новых вариантов антигенов системы HLA [6].

В статье представлено описание нового аллельного варианта гена HLA-DQB1, впервые выявленного в Республике Казахстан.

**Материалы и методы:** В НПЦТ г. Астана в 2011- 2015 гг. было обследовано 3501 потенциальных доноров Национального регистра ГСК и 936 пациентов с онкогематологическими заболеваниями (в возрасте от 0-66 лет).

Препараты ДНК для проведения HLA-типирования были получены из свежей цельной крови (антикоагулянт – ЭДТА) методом колоночной фильтрации с использованием наборов реагентов PROTRANS DNABox 500 FastDNA. Концентрация препаратов ДНК, определенная на спектрофотометре UV-vis NanoDrop 2000 (Канада), составляла 25–40 нг/мкл при соотношении A260/A280 = 1,75–1,95.

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 проводили по технологии Sequencing Based Typing (SBT) с использованием набора реагентов PROTRANS HLA- A\*, B\*, C\*, DRB1\*, DQB1\* (Protrans, Германия), основанные на технологии моноаллельного секвенирования. Анализ полученных сиквентов проводили с использованием программного обеспечения SequencePilot.

Капиллярный электрофорез осуществляли с использованием генетического анализатора 3500xl (Applied Biosystems, США). Полученные сиквенты просматривали в программном обеспечении SeqPilotv3.14. с использованием библиотек HLA-аллелей – IMGT/HLA.

Частоты HLA-аллелей и частоты их гаплотипов были определены методом максимального правдоподобия с помощью алгоритма максимизации ожидания для данных с неизвестной гаметической фазой [7-8], реализованным в программном обеспечении Arlequin v.3.1. Стандартные отклонения рассчитывали при начальном значении итераций, равном 100. В случае определения одного аллеля индивидум считали гомозиготным по данному аллелю.

**Результаты и обсуждение.** В сентябре 2012 года у 83-го по счету онкогематологического пациента с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) по методу аллельспецифического секвенирования была обнаружена неоднозначность во II классе системы HLA, в локусе DQB1, такая же неоднозначность была найдена и у потенциальных доноров по материнской линии: у матери и бабушки.

У пациента был получен следующий результат HLA-типирования: HLA-A\*03:01, \*31:01, B\*07:02, \*35:01, C\*03:03, \*03:03, DRB1\*01:01, \*11:01, DQB1\*03, 05:01. Новый аллель похож на известный аллель HLA-DQB1\*03:01. Отличие находится в экзоне 2 в позиции 223. В этой позиции представлен аденин (A), в то время как до этого дня в этой позиции был описан только гуанин (G) (рисунок 1).

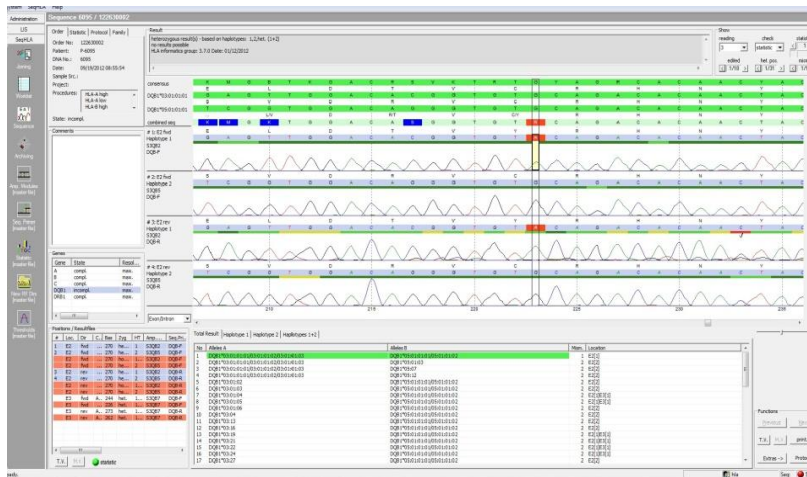


Рисунок 1 - Электрофореграммасиквенса 2 экзона HLA-DQB1\* локусаобразца ДНК пациента. В 223 позиции представлен четкий пикаденина, когда в консенсусе описан только гуанин

Для исключения данного изменения от точечной мутации было проведено семейное обследование. В итоге было замечено, что такая же картина наблюдалась в образцах крови матери (рисунок 2) и дедушки (рисунок 3) по материнской линии.

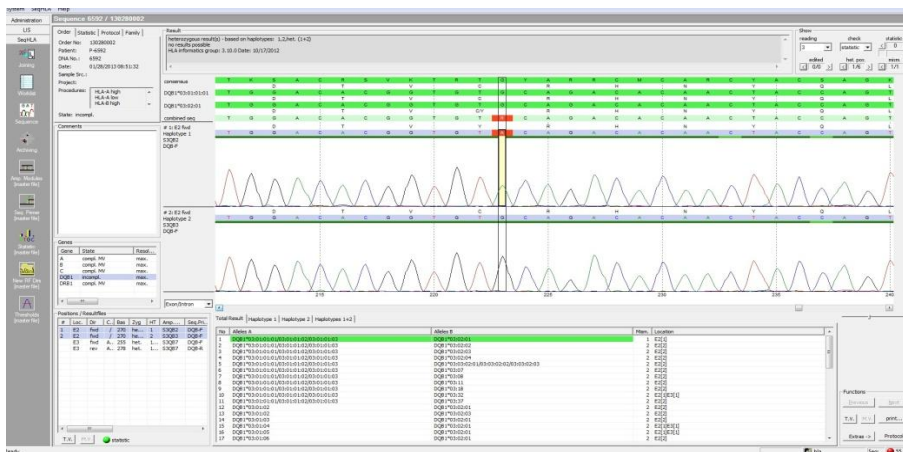


Рисунок 2- Электрофореграмма сиквенса 2 экзона HLA-DQB1\* локуса образца ДНК мамы пациента. На 223 позиции также выявлен аденин, а не гуанин

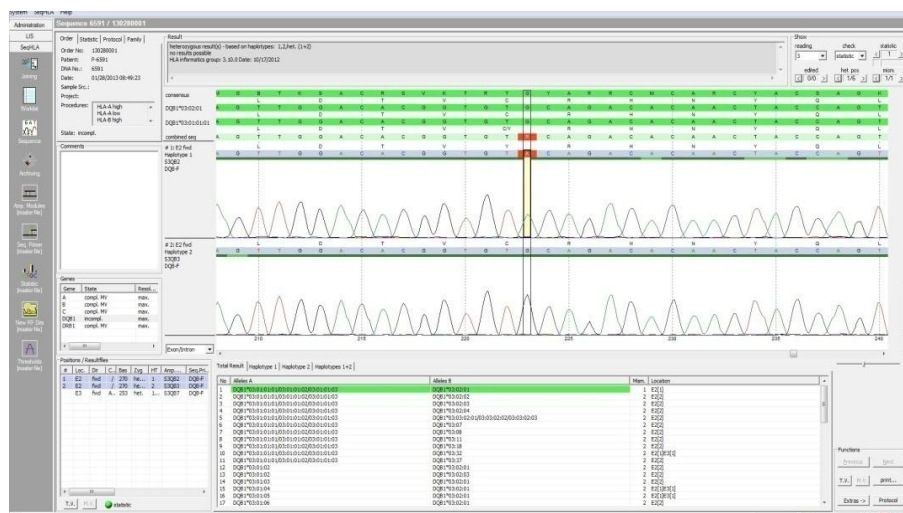


Рисунок3- Электрофореграмма сиквенса образца ДНК дедушки пациента по материнской линии. На 223 позиции также выявлен аденин, а не гуанин

Результаты типирования потенциального донора мамы методом SBT: HLA-A\*24:02:01G, \*31:01:02; HLA-B\*35:01:01G, \*40:02:01; HLA-C\*03:03:01G, \*03:04:01G; HLA-DRB1\*08:02:01, \*11:01:01G; HLA-DQB1\*03:02:01G, \*03. Результаты типирования дедушки по материнской линии следующие: HLA-A\*24:02:01G, \*31:01:02; HLA-B\*35:01:01G, \*40:02:01; HLA-C\*03:03:01G, \*03:04:01G; HLA-DRB1\*08:02:01, \*11:01:01G; HLA-DQB1\*03:02:01G, \*03. Выявленный новый аллельный вариант был подан на регистрацию в WHO Nomenclature Committee via the IMGT/HLA Database) под номером заявления HWS 10018423 и получил официальное название: **HLA-DQB1\*03:82** (рисунок 4).



**Professor Steven GE Marsh**  
Deputy Director of Research  
**ANTHONY NOLAN**  
Research Institute  
The Royal Free Hospital  
Pond Street  
London NW3 2QG  
**020 7284 8321**  
steven.marsh@ucl.ac.uk

Dr Aida Turganbekova  
HLA-Laboratory  
Blood Center  
Keray, Zhanibek Khans, 10  
Astana  
010000  
Kazakhstan

30 June, 2013

Dear Dr Aida Turganbekova

Thank you for the communication regarding your new HLA sequence (submission number HWS10018423). The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA System has officially named your sequence:

**DQB1\*03:82**

This information will be included in the next full Nomenclature report and will also be listed in a monthly update on new sequences assigned which will be published in *Tissue Antigens*, *Human Immunology* and the *International Journal of Immunogenetics*.

In the publication where this sequence first appears, it is suggested a sentence on the nomenclature should be added:

*The name DQB1\*03:82 has been officially assigned by the WHO Nomenclature Committee in June 2013. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent Nomenclature Report (Marsh et al. 2010), names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of such new names will be published in the following WHO Nomenclature Report.*

**Reference**

Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Fernández-Viña M, Geraghty DE, Holdsworth R, Hurley CK, Lau M, Lee KW, Mach B, Maiers M, Mayr WR, Müller CR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Tiercy JM, Trowsdale J : Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. *Tissue Antigens* (2010) 75 291-455

I would appreciate a copy of any paper describing your allele sequence, once it has been published.

Best wishes,

Professor Steven GE Marsh  
Chairman, WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System

hla.alleles.org  
www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla

@anthonymolan anthonymolan  
Anthony Nolan is a registered charity no 803716/SC038827 and registered as a limited company no 2379280 in England and Wales. Registered address: Royal Free Hospital, Pond Street, London NW3 2QG



Рисунок 4 - Свидетельство номенклатурного комитета ВОЗ на DQB1\*03:82 аллельный вариант

**Заключение:** Методом аллельспецифического секвенирования у казахстанского онкогематологического пациента с ОМЛ выявлен новый аллельный вариант HLA II класса локуса DQB1\*03:82. Новый аллель похож на уже ранее известный аллель HLA-DQB1\*03:01, отличается заменой в кодоне 223 (TGC>TAC), приводящей к замене аденина на гуанин в 223 пептидсвязывающей бороздке. Показано, что аллель является наследуемым, а не возникшим в результате мутации при ОМЛ.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- 1 Хаитов Р.М., Алексеев Л.П., Кофиади И.А. Иммуногенетика и персонализированная медицина // Физиология и патология иммунной системы. - 2016. - №20(6). - С. 3-23.
- 2 Румянцев А.Г., Масчан А.А. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей // Медицинское информационное агентство. - 2003. - С.912-918.
- 3 Савченко В.Г. Трансплантация костного мозга в онкогематологии. Клиническая онкогематология // Фундаментальные исследования и клиническая практика. - 2010. - №3(4). - С. 410-411.
- 4 Ефимов Г.А., Вдовин А.С., Григорьев А.А., Филькин С.Ю., Быкова Н.А., Савченко В.Г. Иммунобиология острой реакции «трансплантат против хозяина» // Медицинская иммунология. - 2015. - №17(6). - С. 499-516.
- 5 Кузьмич Е.В., Алянский А.Л., Иванова Н.Е. Анализ результатов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в зависимости от степени HLA-подбора пациента и неродственного донора // Онкогематология. -2014. - №3. - С. 25-31.
- 6 Логинова М.А., Парамонов И.В., Павлов В.Н., Сафуанова Г.Ш. Генетические особенности популяции, проживающей на территории Республики Башкортостан // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2016. - №1. - С. 58-66.
- 7 Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin. (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis //Evolutionary Bioinformatics On-line. - 2005. - №1. - С. 47-50.
- 8 Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population // Molecular Biology and Evolution. -1995. - №12. - С. 921-927.

**Ж.К. Бүркітбаев<sup>1</sup>, С.А. Абдрахманова<sup>1</sup>, И.Р. Рамильева<sup>1</sup>, А.А. Турғанбекова<sup>1</sup>, Д.К. Баймұқашева<sup>1</sup>, Е.Б. Жибурут<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Қазақстан республикасы денсаулық сақтау министрлігі «Трансфузиология ғылыми-өндірістік орталығы» ШЖҚ РМК, Астана қ, Қазақстан

<sup>2</sup>РФ Денсаулық сақтау министрлігі "Н.И. Пирогов атындағы ұлттық медико-хирургия орталығы" ФМБК, Мәскеу, Ресей

#### **АҒЗАЛАР МЕН ТІНДЕРДІ ТРАНСПЛАНТТАУ ҮШІН ТІН ҮЙЛЕСІМДІЛІГІ АНТИГЕНДЕРІН АНЫҚТАУ. ЖАҢА HLA-DQB1\*03:82 АЛЛЕЛЬДІ АНЫҚТАУ**

**Түйін:** Мақалада Қазақстан Республикасында бірінше рет анықталған HLA-DQB1 тұқымының жаңа аллельдік нұсқасының сипаты ұсынылған. Астана қаласының Трансфузиология ғылыми-өндірістік орталығында 2011-2015 жылдары гемопозддік дің жасушалары Ұлттық Тіркеудің 3501 әлеуетті доноры және онкогематологиялық аурулармен ауыратын (жастары 0-66 жастан бастап) 936 емделуші тексерілді. Аллельдік ерекше секвенирлеу әдісімен Қазақстандық асқынған миелобластық аққандық (АМА) диагнозы бар онкогематологиялық емделушіде жаңа аллельдік нұсқасы HLA II класс DQB1\*03:82 локусы анықталды. Жаңа аллель HLA-DQB1\*03:01 алдыңғы белгілі аллельге ұқсайды, 223 пептид байланыстырушы жырашығында аденинді гуанинге алмастыруға әкелінін, 223 (TGC>TAC) кодонды ауыстыруда ерекшеленеді. Аллель тұқым қуалаушы болып табылады, ал АМА кезіндегі өзгеріс нәтижесінде туындамағаны көрсетілген.

**Түйін сөздер:** HLA бөлу және ерекшелігі; жаңа аллельдік нұсқа, HLA-DQB1\*03:82.

**Z.K. Burkitbayev<sup>1</sup>, S.A. Abdrakhmanova<sup>1</sup>, I.R. Ramilyeva<sup>1</sup>, A.A. Turganbekova<sup>1</sup>, D.K. Baymukasheva<sup>1</sup>, E.B. Zhiburt<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>RSE on REM «Scientific-Production Center of Transfusiology», Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, Astana, Kazakhstan

<sup>2</sup>FSBI «National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov» Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

#### **DETERMINATION OF HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS FOR ORGAN AND TISSUE TRANSPLANTATIONS. DETECTION OF A NEW ALLELE HLA-DQB1\*03:82**

**Resume.** The study shows the description of a new allelic variant of the HLA-DQB1 gene, first identified in the Republic of Kazakhstan. From 2011 to 2015 at the Scientific-Production Center of Transfusiology of Astana city, 3501 potential donors for blood stem cell transplantation for the National Register of Blood and 936 patients with oncohematological diseases (aged 0-66 years) were analysed. During the allele-specific sequencing of Kazakhstani oncohematological patient with acute myeloid leukaemia (AML), a new allelic variant of HLA II class DQB1\*03:82 loci was detected. The novel allele is similar to the existing HLA-DQB1\*03:01 with a single non-synonymous difference, at position 223 peptide binding groove G>A (codon 79 TGC to TAC). It is shown that this novel allele has been inherited and was not because of mutation in AML.

**Keywords:** Distribution and specificity of HLA, a new allelic variant, HLA-DQB1\*03:82.