

На правах рукописи

Макарик Татьяна Викторовна

**Молекулярные возможности генотипирования антигенов тромбоцитов
человека.**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2005

Работа выполнена в Государственном учреждении
Гематологический научный центр Российской Академии медицинских наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Судариков Андрей Борисович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Хамаганова Екатерина Георгиевна;
доктор медицинских наук
Лапенков Михаил Иванович.

Ведущая организация: Институт биологии гена Российской академии наук.

Защита состоится « 13 » ноября 2005г., в 14 часов на
заседании диссертационного совета Д 001.042 02 в Гематологическом научном
центре РАМН (125167, г.Москва, Новозыковский пр-д, д. 4а).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Гематологического
научного центра РАМН.

Автореферат разослан « 18 » октября 2005г.

Учсный секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Зыбунова Е.Е

2006-4
17675

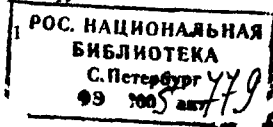
2188518

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность темы диссертации. Антигены тромбоцитов человека (НРА) включают 16 известных на сегодняшний день биаллельных систем. Каждый аллоантиген, как было показано, является результатом изменения единичного нуклеотида в последовательности ДНК, приводящего к замене аминокислоты на белковом уровне. Это приводит к изменению третичной структуры мембранных гликопротеинов и, соответственно, возникновению разных эпитопов – мишеней для трансфузионной аллоиммунизации. Аллоиммунизация к антигенам тромбоцитов может вызывать пост-трансфузионную пурпуру и рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов, кроме того, при беременности аллоиммунизация может быть причиной тромбоцитопении новорожденного. Необходимым компонентом диагностики и последующего лечения пациентов с этими синдромами является возможность быстрого и точного типирования антигенов тромбоцитов. Традиционно, при определении фенотипа тромбоцитов используют аллоиммунную сыворотку человека, однако, не ко всем антигенам системы НРА получены антитела. Кроме того, в случаях заболеваний системы крови, низкий уровень тромбоцитов у значительной части пациентов ограничивает возможность серологического типирования тромбоцитов.

В последнее время для типирования НРА применяют методы, основанные на ДНК-диагностике, такие как полимеразная цепная реакция с последующей рестрикцией полиморфных фрагментов (PCR-RFLP) и секвенирование ДНК. Эти методы достаточно сложны и дорогостоящи. В отличие от них новый подход с использованием в полимеразной цепной реакции сиквенса-специфичных праймеров представляет собой технически простой и экономичный метод генотипирования НРА. Эффективная амплификация возможна только тогда, когда 3'-конец праймера комплементарен последовательности сайта аллельной вариации. Используя серию праймеров, каждый из которых специфично амплифицирует только один аллель НРА, можно сделать вывод о присутствии или отсутствии соответствующих антигенов.

Частоты аллоантигенов тромбоцитов человека различаются между расами и этническими группами. Недавние популяционные исследования показали существенные различия в распределении НРА у представителей европеоидной и монголоидной рас. Получены данные о встречаемости НРА-генов в выборках жителей России. Изучение частоты аллелей НРА позволяет сделать вывод о перемещении генов и получить важную иммуногенетическую характеристику популяции. Практическое значение генотипирования НРА в первую очередь проявляется в трансфузиологии. Генотипирование антигенов



тромбоцитов человека методом полимеразной цепной реакции позволит проводить трансфузии тромбоцитов с учетом их антигенной структуры у донора и реципиента

Цель работы. На основе полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных праймеров разработать тест-систему для изучения распределения пяти клинически важных антигенов тромбоцитов (HPA 1-5) у кадровых доноров компонентов крови.

Задачи исследования.

1. Оптимизация тест-системы на основе полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфических праймеров; сравнение результатов генотипирования, полученных с помощью модифицированной нами тест-системы и тест-системы фирмы «PROTRANS».
2. Использование модифицированной тест-системы для генотипирования кадровых доноров компонентов крови по системе HPA.
3. Изучение иммуногенетических параметров HPA у кадровых доноров компонентов крови и представителей некоторых этнических групп России
4. Оценка целесообразности организации банка типированных доноров, необходимого для обеспечения HPA-совместимых трансфузий.

Научная новизна. Разработана модифицированная тест-система на основе полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфических праймеров для генотипирования антигенов тромбоцитов человека. Рассчитаны иммуногенетические параметры HPA у кадровых доноров компонентов крови, а также получены ориентировочные данные о распределении частот аллелей и генотипов в двух генетически отдаленных этнических группах (армяне и хакасы). Предложен подход к формированию контингента HPA-типированных доноров в России.

Практическое значение работы. Предложенная в работе модифицированная тест-система на основе полимеразной цепной реакции рекомендуется к использованию для генотипирования антигенов тромбоцитов доноров и реципиентов с целью предотвращения посттрансфузионных осложнений и создания контингента типированных по HPA кадровых доноров компонентов крови

Основные положения, выносимые на защиту. Разработана отечественная тест-система на основе полимеразной цепной реакции с использованием сиквенс-специфичных праймеров для HPA-генотипирования. Определены основные иммуногенетические параметры HPA у кадровых доноров г. Москвы, частота аллелей и генотипов HPA у представителей некоторых этнических групп. Создана математическая модель для оценки

величины когорты НРА-типированных доноров, необходимых для пациентов с заболеваниями системы крови.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены на 19-й Европейской конференции по иммуногенетике и гистосовместимости (Стамбул, 2005г.) и на 28-й конференции «Лейкозы и лимфомы. Терапия и фундаментальные исследования» (Москва, 2005г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 4 работы.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 74 страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа содержит 8 рисунков, 3 диаграммы и 14 таблиц. Список цитированной литературы включает 78 наименований.

Работа выполнялась в лаборатории молекулярной гематологии ГНЦ РАМН (зав.лаб., к.б.н. Судариков А.Б.). Раздел работы по иммуногенетике, иммунологии тромбоцитспецифических антигенов системы НРА, расчет иммуногенетических параметров НРА выполнен в лаборатории иммуногематологии ГНЦ РАМН под руководством зав.лаб., к.м.н. Головкиной Л.Л. Раздел работы по определению величины контингента типированных доноров выполнен совместно с зав.лаб. биostatистики ГНЦ РАМН, к.ф.-м.н. Куликовым С М

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Материалы и методы.

Образцы и выделение ДНК. Всего обследовано 287 человек. Образцы крови были получены у 197 кадровых доноров компонентов крови станции переливания крови Гематологического научного центра РАМН (благодарим за сотрудничество гл.врача СПК ГНЦ РАМН Орлову Г.К. и зам.гл.врача, к.м.н. Шумилову Л.Л.), а также у 32 представителей армянской национальности (выражаем благодарность в подборе материала ведущему научному сотруднику, к.м.н. Меликян А.Л., отделение Поликлиники ГНЦ РАМН). Кроме того, проанализировано 28 образцов ДНК, выделенной из лейкоцитов крови представителей хакасской национальности (материал любезно предоставлен зав.лаб. Иммунологии ГНЦ РАМН Зарешкой Ю.М.). 30 образцов ДНК с известным генотипом любезно предоставлены зав.лаб. иммуногематологии, к.м.н. Головкиной Л.Л.

ДНК выделяли из лейкоцитов по модифицированному «солевому» протоколу. Эритроциты лизировали добавлением 30 мл буфера для лизиса эритроцитов (1хRCLB: 1мМ NH_4CO_3 , 115мМ NH_4Cl) к 10 мл крови (9 мл цельной крови, 1 мл 4% цитрата натрия). Суспензию центрифугировали при 1200 об/мин 10 минут, осадок ресуспендировали в 4 мл

буфера (1xSSC: 150mM NaCl, 15mM Na₂C₆H₅O₇·x5H₂O) и центрифугировали при 1200 об/мин 5 мин. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 600 мкл лизирующего буфера (1xWCLB: 100mM Tris-Cl, pH7.6, 40mM EDTA, 50mM NaCl, 0,2% SDS, 0,05% NaN₃), затем добавляли 200 мкл насыщенного раствора NH₄Cl, тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали при 12000 об/мин 5 минут. Супернатант аккуратно отбирали в другую пробирку с 800 мкл изопропанола, перемешивали на вортексе, затем ДНК переносили в пробирку с 1 мл 80% этанола и центрифугировали на максимуме 10 минут. Осадок растворяли в 200 мкл дистиллированной воды. Концентрацию ДНК анализировали на спектрофотометре (Beckman DU-64), в реакцию брали 100 нг.

Полимеразная цепная реакция с использованием модифицированных сиквенс-специфических праймеров. Последовательности олигонуклеотидных праймеров приведены в таблице 1. Для каждого аллельного гена НРА использовали два сиквенс-специфических праймера, различающихся одним нуклеотидом на 3' конце, последовательность которых соответствовала последовательности геномной ДНК, кодирующей искомые белки. Нами были модифицированы праймеры для НРА-3, -5 локусов. Это было сделано с целью оптимизации условий и температурного режима амплификации, чтобы все праймеры специфично работали при температуре отжига 68°C

Таблица 1. Последовательности праймеров для НРА 1-5 локусов.

НРА	Специфичность	Последовательность* (5'-3')	Размер праймера	Размер амплификата
НРА 1	1a	tcaggtcacagcgggtgagcgca	24	90
	1b	tcaggtcacagcgggtgagcgcg	24	
	общий	ctgcaggaggttagagagtcgccatag	26	
НРА 2	2a	gccccagggtcctctgac	18	258
	2b	gccccagggtcctctgat	18	
	общий	tcagcattgtcctgcagcca	20	
НРА 3	3a	gaatgggggaggggctgggga	21	230
	3b	gaatgggggaggggctggggc	21	
	общий	ctccgacctgctctatccctgga	24	
НРА 4	4a	gttgccaccagatgcg	18	120
	4b	gttgccaccagatgca	18	
	общий	cagggggttttcgagggcct	19	
НРА 5	5a	agtggcagagtctacctgtttactatcaag	30	246
	5b	agtggcagagtctacctgtttactatcaaaa	30	
	общий	cgaagacctctcatggaatatggcagta	28	
Полож. контр.	Фактор роста	tgccctcccaaccattccctta	22	434
		ccactcacggattttctgttctttc	26	

*Для подбора сиквенс-специфических праймеров использовали данные литературы и GenBank.

Комбинация каждого специфичного праймера с общим праймером позволяет получать специфическую амплификацию индивидуальных НРА аллелей. Каждую реакцию

контролировали включением пары праймеров, которые амплифицировали фрагмент размером 434 нп гена фактора роста человека. Это обеспечивало положительный контроль для каждой реакции амплификации. Для каждого образца ДНК выполняли десять отдельных реакций. В каждой пробирке ПЦР реакции присутствовали сиквенс-специфичный праймер, общий праймер и пара праймеров внутреннего положительного контроля.

В каждую пробирку для амплификации (15 мкл) добавляли 100 нг ДНК в дистиллированной воде; 1,5 мкл 10×PCR буфера (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 9, 1% Triton X100, 25 mM MgCl₂); 200 мкМ смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP); по 2рМоль аллель-специфичных и общего праймеров и 1рМоль контрольных праймеров, 8 мкл дистиллированной воды, 1 ед Taq ДНК полимеразы. Для одновременного генотипирования нескольких человек использовали 96-луночные планшеты. Планшеты с разведенными праймерами (2рМоль в 7,5 мкл) готовили заранее и хранили при -20°C. Программа амплификации была адаптирована для прибора Perkin Elmer: 95°C, 5 минут, 25 циклов. 95°C, 30 секунд; 68°C, 1 минута, 72°C, 45 секунд.

Анализ результатов осуществлялся методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Статистическая обработка данных. Расчет частот НРА-генов проводили по формуле: $P = D + Dd/2$, где P – частота гена, D – частота гомозиготных особей по первому гену, Dd – частота гетерозиготных особей.

На основе эмпирически полученных генных частот рассчитывали частоты генотипов по формуле: $p^2AA + 2pqAB + q^2BB = 1$, где p^2AA – количество лиц, гомозиготных по первому гену; q^2BB – количество лиц, гомозиготных по второму гену; $2pqAB$ – количество лиц, гетерозиготных по обоим генам диаллельной системы.

Количество особей гомозиготных по первому гену вычисляли по формуле $AA = p^2 \times N$; гомозиготных по второму аллельному гену – по формуле $BB = q^2 \times N$, частоту гетерозиготных особей – по формуле $AB = 2pq \times N$, где N – количество исследованных лиц, p – частота первого аллельного гена, q – частота второго аллельного гена.

Степень достоверности существующего распределения генов в популяции устанавливали при сравнении экспериментально полученных и расчетных данных путем определения показателя χ^2 (хи-квадрат) по формуле: $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$, где O – эмпирические данные, E – расчетные данные. Вероятность P для отклонения от ожидаемого значения высчитывали по таблице значения χ^2 (таблица Фишера) с соответствующей степенью свободы. Для 5%-го уровня значимости при одной степени свободы $\chi^2 = 3,84$, при двух степенях свободы $\chi^2 = 5,991$.

Для таблицы 2x2 или при степени свободы $v=1$ использовали поправку на ошибку группировки Йетса $\chi^2 = (O - E - 0,5)^2 / (a+b)(c+d)(a+c)(b+d)$.

Полученные значения генных частот применяли для определения частоты гаплотипов и величины гаметной ассоциации. Экспериментальные частоты гаплотипов НРА-1, -3 определяли по результатам НРА-генотипирования. Ожидаемую частоту указанных гаплотипов рассчитывали по формуле: $H = p_1 \times p_2 + \Delta$, где p_1 и p_2 – ожидаемые частоты аллелей генов в популяции, H – частота гаплотипа при свободной рекомбинации, Δ – величина неравновесного сцепления или гаметная ассоциация.

Величину неравновесного сцепления Δ вычисляли по формуле: $\Delta = \sqrt{d/N} - \sqrt{(b+d)(c+d)/N^2}$, где b , c – количество индивидов с одним из рассматриваемых генов, d – количество индивидов без обоих генов, a – количество людей с обоими генами, N – сумма данных по таблице 2x2 или $a+b+c+d$.

Коэффициент корреляции вычисляли по формуле: $r = \sqrt{\chi^2/N}$, где N – сумма данных по таблице 2x2 или $a+b+c+d$, $\chi^2 = (ad-bc)^2 \times N : [(a+c)(c+d)(a+b)(b+d)]$.

Генетическую дистанцию между народами (популяциями) рассчитывали по формуле: $d_{1,2} = \sqrt{\sum (p_1 - p_2)^2/n}$, где $d_{1,2}$ – генетическая дистанция между популяциями 1 и 2, p_1 и p_2 – частота аллеля в популяциях, n – количество сравниваемых пар аллелей.

Вычисляли значение критерия z-статистики (с учетом поправки на аппроксимацию биномиального распределения нормальным) по формуле: $z = (P - P_p / - 1/2n) / m_p$, где P – относительная частота, наблюдаемая в выборке; значение p вычисляли по значению z при помощи программы BIOSTAT.

Для оценки размера необходимого донорского контингента были сделаны следующие допущения:

- 1 Доноры и реципиенты однородны в генетическом аспекте, то есть принадлежат одной расово-национальной популяции. В нашем конкретном случае – это жители Москвы.
2. Совместимость реципиента и донора определялась по локусам НРА 1, 2, 3, 5 по следующему правилу: а) гомозиготный по гену конкретного локуса реципиент совместим только с гомозиготным по тому же аллельному гену донором, гетерозиготный по аллельным генам конкретного локуса реципиент совместим (по этому локусу) с донором, имеющим ген в гомо- или гетерозиготном состоянии, б) донор и реципиент должны быть совместимы по всем клинически значимым генам локусов НРА (НРА- 1, 2, 3, 5).
- 3 Организация контингента НРА-типированных доноров считалась практически целесообразной, если удавалось подобрать необходимую для курса терапии группу доноров для одного реципиента с 90% вероятностью (в 9 случаях из 10).

4. Для обеспечения курса трансфузионной терапии одному больному с заболеванием системы крови (апластической анемией) необходимо в среднем не менее 100 потенциальных доноров, количество которых было взято с учетом вероятного отказа донора от изъятия у него тромбоцитов или его временной недосыгаемости.

Для обозначения генотипа донора/реципиента использовали следующую форму: $G = g_1, g_2, g_3, g_5$, где g_i – генотип по i -локусу, т.е. $g_i = \{aa, ab, bb\}$, $i = \{1, 2, 3, 5\}$

Весь список возможных комбинаций генотипа по 4 локусам выглядел следующим образом: $G_1=aa\ aa\ aa\ aa$, $G_2=ab\ aa\ aa\ aa$, $G_3=bb\ aa\ aa\ aa$, $G_4=aa\ ab\ aa\ aa \dots G_{81}=bb\ bb\ bb\ bb$.

Пусть $P = \{p_1, p_2, \dots, p_{81}\}$ – распределение вероятности генотипа в исследуемой популяции. Вероятность НРА совместимости реципиента с генотипом G_k и случайного донора вычисляли по формуле: $S_k = \sum_{i=1}^{81} p_i \cdot d_{ki}$, где p_i – вероятность генотипа G_i , d_{ki} – индикатор совместимости генотипа реципиента G_k и генотипа донора G_i (то есть, $d_{ki} = 1$, если генотипы совместимы, $d_{ki} = 0$ – в противном случае).

Считали, что доноры в банк доноров отбираются из популяции случайно, т.е. нет плановой селекции доноров, основанной на генотипе. В этом случае распределение генотипов в донорском пуле, такое же как и в группе реципиентов – популяционное.

Вероятность того, что в банке доноров объема N число совместимых с генотипом G_k меньше чем m , вычисляли в соответствии с биномиальным распределением [11].

$\pi_k = b(m, N, S_k) = \binom{N}{m} \cdot S_k^m \cdot (1 - S_k)^{N-m}$, где S_k – условная вероятность совместимости с генотипом реципиента G_k вычисляемая по формуле (2).

Если реципиенты выбираются из той же популяции, что и доноры, общая вероятность неудачи подбора необходимого числа m доноров из пула объема N будет складываться из вероятностей частных неудач для конкретных генотипов (G_k):

$$W = \sum_{k=1}^{81} p_k \cdot \pi_k$$

Зависимость вероятности неудачи подбора НРА доноров рассчитывали для различных объемов банка доноров с помощью формул, в которые, вместо теоретического распределения $\{p_k, k=1, \dots, 81\}$, подставляли полученные нами значения частот генотипов у доноров станции переливания крови ГНЦ РАМН.

Результаты и обсуждение.

ПЦР с использованием модифицированных сиквенс-специфичных праймеров. Условия проведения ПЦР отрабатывали на образцах ДНК доноров с известным генотипом, который определяли с помощью тест-системы фирмы "PROTRANS". Последовательности аллель-специфичных праймеров для амплификации локусов HPA были взяты из разных источников:

- 1) праймеры для HPA-1, -2, -4, -5 были разработаны G. Cavanagh et al. (1996);
- 2) праймеры для HPA-3 были разработаны Jau-Yi Lyou et al. (2003).

В первом случае отжиг праймеров авторы предлагали проводить в следующей последовательности: 5 циклов при температуре 70°C, 20 циклов при температуре 65°C, 8 циклов - 55°C. Во втором случае – отжиг праймеров предлагали проводить при температуре 61°C. Нами были модифицированы праймеры для амплификации локусов HPA-3, -5 к 5'-концу последовательности праймеров добавили несколько нуклеотидов (Таблица 2).

Таблица 2. Модификация праймеров для амплификации локусов HPA-3 и HPA-5.

HPA	Специфичность	Последовательность (5'-3')	Размер прайма а
HPA 3	3a	(gaat) *gggggaggggctgggga	21
	3b	(gaat)gggggaggggctggggc	21
	общий	(ctcc)gacctgcctacatcctgga	24
HPA 5	5a	(agtggcag)agctcacctgtttactatcaaaag	31
	5b	(agtggcag)agctcacctgtttactatcaaaa	31
	общий	(cgaagac)cctcatggaaaatggcagta	28

*Скобками выделены добавленные нуклеотиды.

Это позволило проводить амплификацию всех пяти локусов HPA при одной температуре - 68°C. 197 доноров были протестированы по HPA 1-5 локусам методом полимеразной цепной реакции с использованием аллель-специфичных праймеров. Примеры результатов, полученных этим методом показаны на рисунке 1.

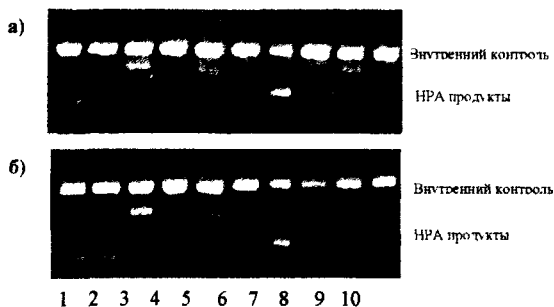


Рисунок 1. Генотипирование HPA 1-5 локусов методом сиквенс-специфичной ПЦР.

Дорожки 1 – HPA1a, 2 – HPA1b, 3 – HPA2a, 4 – HPA2b, 5 – HPA3a, 6 – HPA3b, 7 – HPA4a, 8 – HPA4b, 9 – HPA5a, 10 – HPA5b Внутренний контроль - гормон роста человека (HGH), 434 н п.

а) – донор с генотипом HPA-1aa, -2aa, -3aa, -4aa, -5aa, б) – донор с генотипом HPA – 1ab, -2aa, -3ab, -4aa, -5aa

Амплификаты имели ожидаемые размеры для HPA-1 – 90 н п, для HPA-2 – 258 н п, для HPA-3 – 230 н п, для HPA-4 – 120 н п и для HPA-5 – 246 н п. Размер амплификата положительного контроля составил 434 н п.

Нами проведено сравнение модифицированной тест-системы и аналогичной тест-системы фирмы “PROTRANS” Генотипирование «слепым» методом 30 образцов ДНК (любезно предоставленных зав. лаб. иммуногематологии к.м.н. Головкиной Л.Л.) с известным генотипом показало полное совпадение результатов.

Иммуногенетические параметры тромбоцит-специфических антигенов у кадровых доноров компонентов крови г. Москвы и у представителей армянской и хакасской национальностей. Распределение аллелей и генотипов HPA 1-5 у кадровых доноров компонентов крови представлено в таблице (Таблица 3). Частоты аллелей HPA-1a и HPA-1b составили 96,95% и 24,87%, соответственно. Аллели HPA-2a и -2b встречались с частотой 97,46% и 25,38%, соответственно. Аллели HPA-3a и -3b встречались приблизительно с одинаковой частотой – 82,23% и 72,59%. Частота аллелей HPA-5a и -5b составила 98,48% и 14,21%, соответственно. Аллельный ген HPA-4a встречался у всех обследованных лиц, доноров с геном HPA-4b не выявлено.

Таблица 3. Распределение аллелей и генотипов у кадровых доноров г.Москвы.

НРА	Частота аллелей (%)*			Частота генотипов (%)*		
	a	b	aa	ab	bb	
НРА-1	96,95 (191)	24,87 (49)	75,13 (148)	21,83 (43)	3,05 (6)	
НРА-2	97,46 (192)	25,38 (50)	74,62 (147)	22,84 (45)	2,54 (5)	
НРА-3	82,23 (162)	72,59 (143)	27,92 (55)	54,31 (107)	11,77 (35)	
НРА-4	100 (197)	0	100 (197)	0	0	
НРА-5	98,48 (194)	14,21 (28)	87,31 (172)	11,17 (22)	1,52 (3)	

n=197

* В скобках указано количество лиц, имеющих соответствующий ген.

Установлены следующие частоты генотипов: НРА-1a/a – 75,13%, НРА-1a/b – 21,83%, НРА-1b/b – 3,05%; НРА-2a/a – 74,62%, НРА-2a/b – 22,84%, НРА-2b/b – 2,54%; НРА-3a/a – 27,92%, НРА-3a/b – 54,31%, НРА-3b/b – 11,77%; НРА-5a/a – 87,31%, НРА-5a/b – 11,17%, НРА-5b/b – 1,52% Генотипы НРА-4a/b и НРА-4b/b не были выявлены из-за низкой частоты аллеля 4b у белой расы.

Наблюдаемая частота генотипов НРА-1 у кадровых доноров составила в процентах: 1a/a =75,13%, 1 b/b = 3,05%, 1a/b=21,83%. Ожидаемые частоты генотипов НРА-1 отличались незначительно: 1a/a =73,96%, 1 b/b = 1,96%, 1a/b=24,08%. По результатам генотипирования исследуемых людей рассчитывали наблюдаемые (экспериментальные) частоты генов 1a и 1b: они составили 0,86 и 0,14, соответственно. Ожидаемые частоты генов 1a и 1b полностью совпали с экспериментально полученными данными

Наблюдаемые частоты генотипов 2 a/a, 2 a/b, 2b/b составили 74,62%, 22,84%, 2,54%, соответственно (Таблица 4) Ожидаемые частоты генотипов 2 a/a и 2b/b оказались меньше – 73,96% и 1,96%, соответственно. Ожидаемая частота генотипа 2 a/b – больше (24,07%). Наблюдаемая и ожидаемая частоты генов 2a и 2b полностью совпали 0,86 и 0,14, соответственно. Генотипы 3 a/a, 3 a/b, 3b/b имели частоту 27,92%, 54,31%, 17,77%, а по расчетным данным – 30,35%, 49,49%, 20,15%, соответственно. Генотипы 5 a/a, 5 a/b, 5 b/b имели частоту 87,31%, 11,17%, 1,52%, а по расчетным данным – 86,29%, 13,19%, 0,50%, соответственно Экспериментальные частоты генов 3a, 3b и 5a, 5b полностью совпали с ожидаемыми и составили 0,55, 0,45 и 0,929, 0,271, соответственно Степень достоверности существующего распределения генов в популяции устанавливали при сравнении экспериментально полученных и расчетных данных путем определения показателя χ^2 . Во всех случаях этот показатель не превышал значения 3,84 для 5%-го уровня значимости при одной степени свободы, что говорит о корректно выполненном исследовании.

Таблица 4. Расчет ожидаемых генных частот НРА у кадровых доноров компонентов крови г. Москвы.

НРА	Наблюдаемая частота генотипов, %	Ожидаемая частота генотипов, %	Наблюдаемая частота генов	Ожидаемая частота генов	Критерий согласия распр. генов
1 a/a	75,13	73,96	1a = 0,860	1a = 0,860	$\chi^2 = 0,29$
1 a/b	21,83	24,08	1b = 0,140	1b = 0,140	$\chi = 1,78$
1 b/b	3,05	1,96			
2 a/a	74,62	73,96	2a = 0,860	2a = 0,860	$\chi^2 = 0,29$
2 a/b	22,84	24,07	2b = 0,140	2b = 0,140	$\chi = 1,78$
2 b/b	2,54	1,96			
3 a/a	27,92	30,35	3a = 0,550	3a = 0,550	$\chi^2 = 0,90$
3 a/b	54,31	49,49	3b = 0,450	3b = 0,450	$\chi = 1,37$
3 b/b	17,77	20,15			
5 a/a	87,31	86,29	5a = 0,929	5a = 0,929	$\chi^2 = 0,27$
5 a/b	11,17	13,19	5b = 0,071	5b = 0,071	$\chi = 0,01$
5 b/b	1,52	0,50			

Чтобы вычислить экспериментальные частоты гаплотипов НРА-1, НРА-3, сначала определяли количество лиц с определенными сочетаниями генотипов локусов НРА-1 и НРА-3. Все возможные сочетания аллельных генов локусов НРА-1 и НРА-3 были представлены полностью в исследуемой группе кадровых доноров г.Москвы. Часто встречающимися оказались варианты, гомо- и гетерозиготные по «а» и «b» аллелям локуса НРА-1 и гетерозиготные по аллелям локуса НРА-3: сочетания 1aa3ab и 1ab3ab. Реже встретились сочетания 1ab3bb, 1bb3ab, 1bb3aa и 1bb3bb. Сочетания 1aa3aa, 1aa3bb и 1ab3aa заняли промежуточное положение.

Оказалось, что самым распространенным гаплотипом является «1a3a» – он встречается в 47,54 % случаев (Таблица 5). Вторым по встречаемости – 34,50% случаев – гаплотип «1a3b». Гаплотипы «1b3a» и «1b3b» встретились приблизительно одинаково: 9,51% и 8,45% случаев, соответственно. Сочетание НРА-1ab3ab для вычисления частот гаплотипов не учитывалось, поскольку частоту этого сочетания можно оценить только из семейных исследований. При проведении семейных исследований было показано наследование аллельных генов НРА-1 и НРА-3 гаплотипами, что обусловлено их локализацией в одном сегменте 17-ой хромосомы [Головкина Л.Л. и др., 2004].

Таблица 5. Определение частоты гаплотипов аллельных генов локусов HPA-1 и HPA-3 (n = 197).

Сочетания генотипов аллельных генов локусов HPA-1, HPA-3	Количество человек с указанными сочетаниями генотипов	Гаплотипы			
		1a3a	1b3a	1a3b	1b3b
1aa 3aa	37	74	0	0	0
1ab 3ab	55	-	-	-	-
1aa 3bb	20	0	0	40	0
1bb 3bb	3	0	0	0	6
1bb 3aa	3	0	6	0	0
1ab 3aa	15	15	15	0	0
1aa 3ab	46	46	0	46	0
1ab 3bb	12	0	0	12	12
1bb 3ab	6	0	6	0	6
Абсолютное количество гаплотипов	(197-55)х2=284	135	27	98	24
Процентное количество гаплотипов	100	47,54	9,51	34,50	8,45

Ожидаемые частоты гаплотипов рассчитывали с учетом величины гаметной ассоциации (Таблица 6).

Таблица 6. Сравнительные данные по экспериментально рассчитанной и ожидаемой частоте гаплотипов у кадровых доноров компонентов крови г.Москвы (n=197).

Гаплотипы	Экспериментальная частота гаплотипов	Ожидаемая частота гаплотипов
HPA-1a/3a	0,4754	0,4860
HPA-1a/3b	0,3450	0,3750
HPA-1b/3a	0,0951	0,0708

На основании литературных и экспериментально полученных нами данных было проведено сравнение распределения генных частот HPA у кадровых доноров г.Москвы (здесь кадровые доноры г.Москвы представляют смешанную популяцию России) и других народов (по литературным данным представителями разных народов являются доноры крови и ее компонентов). Наши данные о частоте генов HPA схожи с соответствующими данными в европейских популяциях. Не найдено достоверных отличий в распределении генов HPA-1, HPA-3, HPA-5 между донорами г.Москвы и представителями (донорами) Дании, Германии, Финляндии и Словении.

Однако, частота гена HPA-2 у кадровых доноров г.Москвы достоверно отличается от генной частоты у австрийских доноров ($P = 0,036$, $z = 2,094$). Кроме того, нами выявлены статистически достоверные различия в распределении частот генов HPA-1 и HPA-3 у кадровых

Таблица 7. Генные частоты НРА у представителей разных народов.

	Генные частоты, %										К-во исслед. лиц	Ссылка
	НРА-1		НРА-2		НРА-3		НРА-4		НРА-5			
	а	б	а	б	а	б	а	б	а	б		
Россия	0,86	0,14	0,86	0,14	0,55	0,45	1,00	0,00	0,93	0,07	197	Наши данные
Польша	0,87	0,13	0,90	0,10	0,59	0,41	1,00	0,00	0,94	0,06	-	Drzewek et al. (1998)
Финляндия	0,86	0,14	0,91	0,09	0,59	0,41	-	-	0,95	0,05	200	Kekomaki et al. (1995)
Словения	0,81	0,19	0,89	0,11	0,59	0,41	0,99	0,003	0,93	0,07	152	Rozman et al. (1999)
Дания	0,85	0,15	0,93	0,07	0,55	0,45	1,00	0,00	0,90	0,10	200	Simsek et al. (1993)
Австрия	0,85	0,15	0,92	0,08	0,61	0,39	-	-	0,89	0,11	900	Holensteiner et al. (1995)
Англия	0,82	0,17	0,90	0,10	0,61	0,39	1,00	0,00	0,90	0,10	392	Sellers et al. (1999)
Германия	0,82	0,18	0,92	0,08	0,63	0,37	-	-	0,90	0,10	54	Legler et al. (1996)
Испания	0,81	0,19	0,90	0,10	0,65	0,35	1,00	0,00	0,88	0,12	-	Muniz-Diaz et al. (1998)
Италия	0,84	0,16	0,89	0,11	-	-	-	-	-	-	-	Tazzari et al. (1998)
Норвегия	0,87	0,13	0,94	0,06	0,47	0,53	1,00	0,00	0,93	0,07	105	Randen I. et al. (2003)
Франция (север)	0,99	0,01	0,99	0,01	-	-	-	-	0,99	0,01	800	Merieux et al. (1997)
Франция (Прованс)	0,83	0,17	-	-	0,65	0,35	-	-	0,87	0,13	-	Reviron et al. (1992)
Берберы (Марокко)	0,75	0,25	0,82	0,18	0,68	0,32	1,00	0,00	0,86	0,14	110	Ferrer et al. (2001)
Афроамериканцы	0,92	0,08	0,82	0,18	0,63	0,37	1,00	0,00	0,79	0,21	100	Kim et al. (1995)
Таиланд	0,98	0,02	0,94	0,06	0,51	0,49	1,00	0,00	0,96	0,04	137	Shih et al. (2003)
Филиппины	0,98	0,02	0,97	0,03	0,53	0,47	0,99	0,005	0,97	0,03	100	Shih et al. (2003)
Индонезия	0,99	0,01	0,93	0,07	0,51	0,49	1,00	0,00	0,99	0,005	107	Shih et al. (2003)
Тайвань	0,99	0,01	0,96	0,04	0,59	0,40	0,99	0,001	0,98	0,02	566	Shih et al. (2003)
Корея	0,99	0,01	0,87	0,13	0,67	0,33	0,99	0,01	0,97	0,03	200	Seo et al. (1998)
Китай	0,99	0,01	0,98	0,02	0,52	0,48	1,00	0,00	0,96	0,04	100	Chang et al. (1998)
Гонг-Конг	0,99	0,01	0,98	0,02	0,53	0,47	1,00	0,00	0,97	0,03	100	Chang et al. (1998)
Япония	0,99	0,01	-	-	-	-	0,99	0,01	-	-	331	Tanaka et al. (1996)
Бразилия (индейцы)	1,00	0,00	0,96	0,04	0,71	0,29	1,00	0,00	0,96	0,04	95	Chiba et al. (2000)
Бразилия (доноры)	0,93	0,07	0,87	0,13	0,63	0,37	-	-	0,87	0,13	-	Chiba et al. (2000)
Австралия (аборигены)	0,99	0,01	1,00	0,00	0,93	0,07	1,00	0,00	0,75	0,24	185	Bennet et al. (2002), Verran et al. (2000)

доноров г Москвы и марокканских берберов: для локуса HPA-1 значение «Р» составило 0,024 ($z = 2,253$); для локуса HPA-3 значение «Р» составило 0,035 ($z = 2,105$). Население севера Франции достоверно ($P = 0,000$) отличается от доноров г. Москвы по частоте трех аллельных генов HPA – 1, -2, -5 (для локуса HPA-3 нет данных в литературе).

Как видно из таблицы 7, существуют значительные отличия между кадровыми донорами г Москвы (представителями белой расы) и представителями монголоидной расы. Нами выявлены достоверные отличия по локусу HPA-2 между кадровыми донорами г.Москвы и донорами Тайваня, Филиппин, Китая (значение «р» равно 0,0; 0,011; 0,029; соответственно). Кроме того, частота гена HPA-3 отличается у кадровых доноров г Москвы и доноров Кореи и Бразилии (0,019 и 0,013, соответственно). Австралийские аборигены достоверно отличаются от кадровых доноров г.Москвы по всем локусам HPA. Афроамериканцы, которых причисляют к негроидной расе, имеют достоверные отличия от кадровых доноров г.Москвы только по гену HPA-5.

На основании полученных нами данных о распределении генных частот HPA у кадровых доноров г Москвы и найденных в литературе частот генов HPA у представителей других народов рассчитывали величину генетической дистанции (Таблица 8) Наименьшее различие по величине генетической дистанции имели представители Польши, Финляндии, Словении, Дании ($d < 0,05$) Жители Англии и Австрии стоят на одинаковом «расстоянии» от жителей России ($d = 0,0591$) Величина генетической дистанции между российскими донорами и донорами Таиланда, Филиппин, Тайваня, Кореи и Китая была приблизительно одинаковой (чуть больше 0,1). Величина генетической дистанции для представителей Бразилии (индейцы) и Австралии (аборигены) оказалась достаточно высокой: 0,1646 и 0,3245, соответственно.

Таблица 8. Величина генетической дистанции между кадровыми донорами г.Москвы и представителями других стран.

Страна	Величина генетической дистанции	Страна	Величина генетической дистанции
Польша	0,0367	Филиппины	0,1149
Финляндия	0,0424	Китай	0,1241
Словения	0,0474	Тайвань	0,1257
Дания	0,0479	США (черные)	0,1267
Австрия	0,0591	Корея	0,1283
Англия	0,0591	Марокко (берберы)	0,1349
Германия	0,0755	Франция (север)	0,1525
Япония	0,0892	Бразилия (индейцы)	0,1646
Таиланд	0,1044	Австралия (абориг.)	0,3245
Индонезия	0,1134		

На основании результатов генотипирования 32 представителей армянской национальности нами получены предварительные данные о распределении аллелей и генотипов в выборке армян (Таблица 9)

Таблица 9. Распределение аллелей и генотипов НРА среди армян.

НРА	*Частота аллелей, %				*Частота генотипов, %			
	а		b		aa		ab	
НРА-1	93,75	(30)	50	(16)	50	(16)	43,75	(14)
НРА-2	96,88	(31)	34,38	(11)	65,62	(21)	31,25	(10)
НРА-3	87,5	(28)	62,5	(20)	37,5	(12)	50	(16)
НРА-4	100	(32)	0		100	(32)	0	0
НРА-5	100	(32)	15,62	(5)	84,37	(27)	15,62	(5)

N=32

* В скобках указано количество тестируемых лиц.

Группу наблюдения составили те лица, для которых этническая принадлежность прослеживалась в 3-х поколениях.

Аллели 1a и 1b встречались с частотой 93,75% и 50%, соответственно. Частоты генотипов составили: 1a/a - 50%, 1a/b - 43,75%, 1b/b - 6,25%. Аллели 2a и 2b имели частоту 96,88% и 34,38%, соответственно. Частоты генотипов для локуса НРА-2: 2a/a - 65,62%, 2a/b - 31,25%, 2b/b - 3,13%. Частоты генотипов для локуса НРА-3: 3a/a - 37,5%, 3a/b - 50%, 3b/b - 12,5%; частоты аллелей - 87,5% и 62,5% (для 3a и 3b, соответственно). Аллели НРА-4a и НРА-5a встречались в 100% случаев; аллель 5b - в 15,62% случаев. Частота генотипов 5a/a и 5a/b составила 84,37% и 15,62%, соответственно.

Нами протестировано 28 образцов ДНК представителей хакасской национальности. Предварительные данные о частотах аллелей и генотипов НРА представлены в таблице (Таблица 10).

Таблица 10. Распределение аллелей и генотипов у представителей хакасской национальности.

НРА	*Частота аллелей, %				*Частота генотипов, %			
	а		b		aa		ab	
НРА-1	100	(27)	11,11	(3)	88,88	(24)	11,11	(3)
НРА-2	100	(27)	11,11	(3)	88,88	(24)	11,11	(3)
НРА-3	57,14	(16)	78,57	(22)	59,25	(16)	40,74	(11)
НРА-4	100	(27)	0		100	(27)	0	0
НРА-5	100	(27)	3,70	(1)	96,30	(26)	3,70	(1)

N=27

* В скобках указано количество людей.

Аллели НРА-1а, -2а, -4а и -5а присутствовали во всех случаях. Аллели НРА-1b, -2b имели одинаковую частоту – 11,11%. Частоты аллелей 3а и 3b составили 59,25% и 81,48%, соответственно. Частоты встречаемости генотипов для локусов НРА-1, -2 оказались одинаковыми: а/а – 88,88%, а/б – 11,11%; для локуса НРА-3 составили: 3а/а – 59,25%, 3а/б – 40,74%, 3б/б – 40,74%. По нашим данным наблюдалось отсутствие гомозигот по аллелю b в НРА-1, -2, -4, -5. Гетерозиготы НРА-5а/б имели частоту 3,70%.

На основании экспериментально полученных данных вычисляли достоверность отличий частот аллелей и генотипов в исследуемых группах

Частоты аллелей НРА-1а, -2а, -2b, -3b, -5а, -5b не имели значимых отличий во всех сравниваемых группах (Таблица 11). Нами выявлены достоверные различия частоты аллеля «b» в локусе НРА-1 между кадровыми донорами (смешанная российская популяция) и представителями армянской национальности ($P = 0,007$), а также между хакасами и армянами ($P = 0,004$).

Частота генотипа 1а/а у представителей армянской национальности оказалась в 1,5 раза меньше соответствующей частоты у кадровых доноров г. Москвы (50% против 75,13%), в то время как частота генотипа 1а/б – в два раза больше (43,75% против 21,83%).

Среди представителей армянской национальности очень высокой оказалась частота аллеля «b» локуса НРА-1 (50%), в то время как в смешанной российской популяции (кадровые доноры г. Москвы) частота этого аллеля равна 24,87%. Полученные нами данные об отличиях в распределении генных частот НРА у кадровых доноров и представителей армянской национальности можно объяснить принадлежностью к различным этническим группам.

Среди представителей хакаской национальности не встречались гомозиготы по аллелю «b» в локусах НРА-1, -2, -4, -5. Частоты гетерозигот в локусах НРА-1, -2, -5 имели более низкие значения, чем соответствующие частоты генотипов в смешанной российской популяции. Аллели НРА-1а, -2а, -4а и -5а встречались в 100% случаев.

По литературным данным хакасы представлены несколькими субпопуляциями с различным расовым происхождением. Исходя из полученного нами распределения частот аллелей НРА, изучаемая группа относится к монголоидной расе (кызылыцы, качинцы, хойбалы). Кроме того, найдены достоверные отличия частоты аллеля «a» в локусе НРА-3 между кадровыми донорами и представителями хакаской национальности, между хакасами и армянами (значение «P» составило 0,012 и 0,029, соответственно).

При сравнении частот генотипов найдены статистически достоверные отличия между кадровыми донорами и представителями армянской национальности в локусе НРА-1 ($P = 0,014$, $\chi^2 = 8,551$), а также между хакасами и армянами ($P = 0,006$, $\chi^2 = 10,368$).

Таблица 11. Критерий различия аллельных частот у кадровых доноров г.Москвы, представителей армянской и хакасской национальностей.

Этнические группы	НРА-1	НРА-2	НРА-3	НРА-5
доноры и хакасы	$\chi^2_{(2)} = 2,736$ P = 0,255	$\chi^2_{(2)} = 2,844$ P = 0,241	$\chi^2_{(2)} = 8,239$ P = 0,016	$\chi^2_{(2)} = 1,916$ P = 0,384
доноры и армяне	$\chi^2_{(2)} = 8,551$ P = 0,014	$\chi^2_{(2)} = 1,15$ P = 0,563	$\chi^2_{(2)} = 1,407$ P = 0,495	$\chi^2_{(2)} = 0,979$ P = 0,613
хакасы и армяне	$\chi^2_{(2)} = 10,368$ P = 0,006	$\chi^2_{(2)} = 4,578$ P = 0,101	$\chi^2_{(2)} = 4,281$ P = 0,118	$\chi^2_{(1)} = 1,160$ P = 0,281

Как видно из таблицы 12, достоверно отличается частота генотипа НРА-3 у кадровых доноров и представителей хакасской национальности в (P = 0,016, $\chi^2 = 8,239$). Частоты генотипов НРА-2 и НРА-5 не отличаются между всеми исследуемыми группами.

Таким образом, при выборочном обследовании найдены статистически значимые отличия в распределении частот аллелей и генотипов между кадровыми донорами г.Москвы, представителями армянской и хакасской национальностей. Полученные данные позволяют предложить формирование локальных (национальных) когорт доноров.

Таблица 12. Сравнение частот аллельных генов между кадровыми донорами, представителями армянской и хакасской национальностей (по критерию z).

Аллели НРА	доноры и хакасы	доноры и армяне	хакасы и армяне
НРА-1a	P = 0,776	P = 0,693	P = 0,549
-1b	P = 0,179	P = 0,007	P = 0,004
НРА-2a	P = 0,886	P = 0,685	P = 0,930
-2b	P = 0,163	P = 0,394	P = 0,074
НРА-3a	P = 0,012	P = 0,630	P = 0,029
-3b	P = 0,453	P = 0,338	P = 0,188
НРА-5a	P = 0,978	P = 0,891	P = 0,932
-5b	P = 0,222	P = 0,952	P = 0,281

Полученные данные о частоте генов, генотипов и гаплотипов полиморфных локусов НРА-1, -2, -3, -5 позволяют рассчитать все иммуногенетические параметры (частоту генов, генотипов, гаплотипов, величину неравновесного сцепления и генетическую дистанцию), а также необходимую численность когорты типированных доноров для обеспечения трансфузий тромбоцитов реципиентов с любым генотипом.

По данным частотных распределений генотипов в исследованной группе доноров была сделана оценка необходимого объема банка НРА типированных доноров. На рисунке 2 приведена расчетная зависимость вероятности неудачи в подборе 100 НРА совместимых доноров для одного случайного реципиента.

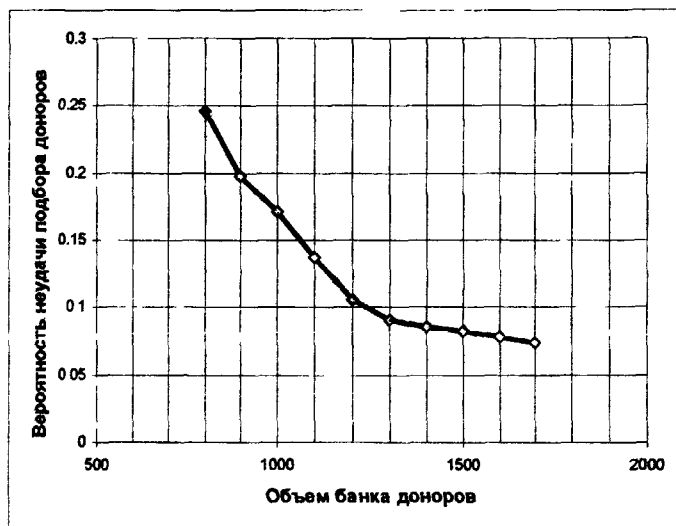


Рисунок 2. Расчетная зависимость вероятности неудачи в подборе 100 НРА совместимых доноров для одного случайного реципиента в зависимости от объема банка доноров.

Если задаться пороговым уровнем неудачи в подборе группы из 100 доноров равным 10% процентам, то из графика видно, что такой уровень обеспечивается банком объема примерно 1300 доноров. Отсюда можно сделать вывод о том, что организация банка НРА типированных доноров может считаться практически целесообразной, если в нем не менее 1500-2000 доноров. Тогда в 90% случаев удастся сформировать группу НРА совместимых доноров достаточного объема для продолжительного курса трансфузионной терапии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Использование комбинации сиквенса-специфических праймеров, каждый из которых специфично амплифицирует только один аллель НРА, позволяет сделать вывод о присутствии или отсутствии соответствующего гена всех пяти локусов НРА: НРА-1, НРА-2, НРА-3, НРА-4 и НРА-5. Кроме того, добавление в каждую пробирку дополнительной пары праймеров, амплифицирующей фрагмент гена фактора роста человека, обеспечивает положительный контроль для каждой реакции амплификации. Генотипирование «слепым» методом образцов ДНК показало полное совпадение результатов, полученных с помощью предлагаемой нами тест-системы и тест-системы фирмы «PROTRANS»

Использование модифицированных нами праймеров для НРА-3, -5 локусов позволяет проводить специфическую амплификацию всех пяти локусов НРА при одинаковой температуре (68°C). В аналогичных тест-системах предлагается проводить отжиг праймеров для разных локусов НРА в нескольких температурных режимах.

С помощью модифицированной нами тест-системы получены данные о частоте аллелей и генотипов HPA у 197 жителей России (кадровые доноры крови и ее компонентов). На основании этих данных рассчитана необходимая численность контингента типированных по HPA доноров – 1500 человек с 90% вероятностью подбора для обеспечения HPA-совместимых трансфузий.

Отличительной особенностью исследуемой группы кадровых доноров г.Москвы выявлена увеличенная частота гена HPA-2b – 25,38%, в то время как средний показатель для лиц белой расы – 13,2%.

Определение величины неравновесного сцепления генов с учетом частоты аллелей HPA выявило незначительную гаметную ассоциацию между генами HPA-1a и HPA-3a, а также между генами HPA-1b и HPA-3b.

Иммуногенетические параметры HPA-генов у кадровых доноров г.Москвы указывают на выраженный полиморфизм локусов HPA-1, -2, -3, -5 Поэтому трансфузии тромбоцитов должны проводиться с учетом их антигенной структуры у донора и реципиента. Это является важным для предотвращения аллоиммунизации больных, развития у них посттрансфузионной тромбоцитопенической пурпуры и иммунологической рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов.

Получены предварительные данные о распределении генов и генотипов в двух этнических группах: у 32 представителей армянской национальности и 28 представителей хакаской национальности (национальность устанавливали путем опроса с учетом этнической принадлежности не менее чем в 3-х поколениях). Выявлены достоверные различия частот аллелей и генотипов в выборках кадровых доноров г.Москвы, представителей армянской и хакаской национальностей.

ВЫВОДЫ.

1. Разработана тест-система на основе полимеразной цепной реакции с использованием сиквенса-специфических праймеров для генотипирования антигенов тромбоцитов человека. Генотипирование «слепым» методом 30 образцов ДНК показало полное совпадение результатов, полученных с помощью предлагаемой нами тест-системы и тест-системы фирмы "PROTRANS".
2. В результате генотипирования 197 кадровых доноров компонентов крови г.Москвы получены данные о распределении частот генов и генотипов HPA, которые оказались сопоставимы с соответствующими литературными данными по генотипированию представителей европейских государств. Отличительной особенностью исследуемой группы кадровых доноров является увеличенная частота аллеля HPA-2b – 25,38%, в то время как средний показатель для лиц белой расы – 13,2%.

3. Разработанная тест-система была верифицирована на двух изолированных этнических группах (представители армянской и хакаской национальностей) Выявлено статистически достоверное отличие частоты аллеля «b» локуса HPA-1 у представителей армянской национальности и смешанной российской популяции (кадровые доноры г Москвы) - 50% и 24,87%, соответственно Среди представителей хакаской национальности гомозиготы по аллелю «b» в локусах HPA-1, -2, -4, -5 не обнаружены.
4. Установлены количественные критерии контингента HPA-типированных доноров, необходимого для обеспечения HPA-совместимых трансфузий Величина контингента HPA-типированных доноров с 90% вероятностью подбора составляет 1500 человек.

Список публикаций по теме диссертации.

1. Макарик Т.В., Головкина Л.Л., Орлова Г.К., Шумилова Л.Л., Судариков А.Б. Генотипирование антигенов тромбоцитов человека методом полимеразной цепной реакции с использованием аллель-специфических праймеров Проблемы гематологии и переливания крови. 2004, 3:27-31
2. Головкина Л.Л., Макарик Т.В., Судариков А.Б. Иммуногенетические параметры тромбоцитспецифических антигенов (HPA) у россиян – основа для формирования контингента типированных доноров. Проблемы гематологии и трансфузиологии 2005, 1:29.
3. Головкина Л.Л., Зотиков Е.А., Макарик Т.В., Судариков А.Б. Распространенность тромбоцитспецифических антигенов у россиян как основа формирования контингента типированных доноров. Сборник «Актуальные проблемы трансфузиологии и клинической медицины», г.Киров. 2005, 145-148.
4. Golovkina L.L., Makarik T., Sudarikov A.B. Distribution of HPA-genes and genotypes in the population of Russian unrelated donors. "Genes & Immunity: genetics, genomics and function" 19-th European Immunogenetics & Histocompatibility Conference 23-26 April 2005, Istanbul-Turkey. 2005, V.6 supplement 1, S.22, poster 36.

Благодарности.

За помощь и поддержку в проведении работы выражаем искреннюю благодарность сотрудникам Гематологического Научного Центра РАМН. зав лаб иммуногематологии, к.м.н. Головкиной Л.Л., , зав лаб. к.ф.-м.н. Куликову С.М., вед.н.с., к.м.н. Меликян А.Л., зав. лаб., чл.корр. РАЕН Зарецкой Ю.М., гл.врачу СПК Орловой Г.К., зам.гл.врача, к.м.н. Шумиловой Л.Л., сотрудникам лаборатории молекулярной гематологии.

№ 19467

РНБ Русский фонд

2006-4
17675

Принято к исполнению 14/10/2005
Исполнено 17/10/2005

Заказ № 1127
Тираж: 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш , 36
(095) 975-78-56
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru