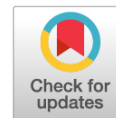


Обзорная статья

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar81197>

Методы типирования генов системы HLA для трансплантации органов и тканей



© С.Н. Колюбаева, Л.А. Мякошина, М.И. Елисеева, Р.И. Глушаков

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

Система антигенов на поверхности клеток человека ответственна за распознавание чужеродных антигенов. При трансплантации органа иммунная система реагирует на все чужеродные антигены, отличные антигенов реципиента. На практике трансплантация солидных органов проводится с той или иной степенью генетического несоответствия, при этом главным принципом, которым следует руководствоваться для предотвращения реакций острого и хронического отторжения трансплантата, избегать неприемлемых несоответствий. Вследствие чего диагностика типирования генов гистосовместимости позволяет подобрать донора, к которому реципиент не будет иметь сенсибилизации. В статье представлен анализ различных методов типирования генов гистосовместимости человека для трансплантации органов и тканей. Открытие полимеразной цепной реакции явилось новым этапом в типировании генов гистосовместимости человека, что дало возможность развития новых методов типирования генов. В результате, разработаны способы типирования генов с использованием секвенаторов в том числе, секвенатора нового поколения MiSeq (*Illumina*, США), геномного времяпролетного анализатора Massarray (*Agena Bioscience*, США). Использование секвенирования привело к возможности одновременного типирования от 24 до 100 образцов ДНК. Современные технологические решения позволили улучшить NGS-секвенаторы 3 поколения и обеспечить максимальную производительность до 30 млрд нуклеотидов за запуск, минимизировать ограничения по длине прочтения ДНК, а также отслеживать параметры, контролировать процесс секвенирования и проводить бейсколлинг в реальном времени. Современные данные с использованием быстрого типирования генов системы гистосовместимости человека (MinION Oxford nanopore) обеспечивают потребности особо чувствительных реципиентов. Предварительные данные предполагают, что данный метод будет более экономичным и эффективным и со временем вытеснит все предыдущие (8 рис., библи.: 40 ист.).

Ключевые слова: аллели; гены; доноры; HLA-типирование; полимеразная цепная реакция; реципиенты; секвенирование.

Как цитировать:

Колюбаева С.Н., Мякошина Л.А., Елисеева М.И., Глушаков Р.И. Методы типирования генов системы HLA для трансплантации органов и тканей // Известия Российской Военно-медицинской академии. 2021. Т. 40. № 2. С. 21–32. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar81197>

Review

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar81197>

HLA typing methods used for organ and tissue transplantation

© Svetlana N. Kolyubaeva, Liliya A. Myakoshina, Marina I. Eliseeva, Ruslan I. Glushakov

S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

The antigen system on the surface of human cells is responsible for recognizing foreign antigens. In organ transplantation, the immune system reacts to all foreign antigens that are different from the recipient's antigens. In practice, solid organ transplantation is carried out with varying degrees of genetic discrepancy, while the main principle that should be followed to prevent acute and chronic transplant rejection reactions is to avoid unacceptable discrepancies. As a result, the diagnosis of typing genes of histocompatibility allows you to select a donor to which the recipient will not have sensitization. The article presents an analysis of various methods for typing human histocompatibility genes for organ and tissue transplantation. The discovery of the polymerase chain reaction was a new stage in the typing of human histocompatibility genes, which made it possible to develop new methods of gene typing. As a result, methods have been developed for typing genes using sequencers, including a new-generation MiSeq sequencer (*Illumina*, USA), a Massarray genomic time-of-flight analyzer (*Agena Bioscience*, USA). The use of sequencing has led to the possibility of simultaneous typing from 24 to 100 DNA samples. Modern technological solutions have made it possible to improve the 3rd generation NGS sequencers and provide a maximum productivity of up to 30 billion nucleotides per run, minimize restrictions on the length of DNA readings, as well as track parameters, control the sequencing process and conduct base-scaling in real time. Modern data using rapid genes typing of the human histocompatibility system (MinION Oxford nanopore) meet the needs of particularly sensitive recipients. Preliminary evidence suggests that this method will be more economical and efficient and will replace all previous ones over time (8 figs, bibliography: 40 refs).

Keywords: alleles; donors; genes; HLA typing; polymerase chain reaction; recipients; sequencing.

To cite this article:

Kolyubaeva SN, Myakoshina LA, Eliseeva MI, Glushakov RI. HLA typing methods used for organ and tissue transplantation. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2021;40(2):21–32. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar81197>

Received: 10.06.2021

Accepted: 15.06.2021

Published: 29.06.2021

ВВЕДЕНИЕ

Реакция «трансплантат против хозяина» заключается в образовании антител к пересаженным тканям. Взаимодействие субпопуляций системы лимфоцитов определяет успех проведения пересадки органа от одного субъекта другому. В основном это Т-хелперы, Т-супрессоры и Т-киллеры. На поверхности клеток расположены антигены индивидуальной тканевой совместимости, которые определяются генами тканевой совместимости. Все антигены принято подразделять на антигены главного комплекса гистосовместимости (МНС; у людей HLA — система человеческих лейкоцитарных антигенов), который отвечает за отторжение пересаженного органа, и антигены малого комплекса гистосовместимости. У человека HLA-комплекс состоит из группы генов, расположенных на коротком плече хромосомы 6 [1, 2].

Необходимо отметить, что отличительной особенностью HLA-системы является ее чрезвычайный полиморфизм. Разнообразие аллельных вариантов дает невероятное число их сочетаний [3], в чем и заключается одна из трудностей методических подходов для их определения.

Для исследования антигенов, которые относятся к I классу (A, B), используются серологические методы, антигены II класса (DR и DQ) определяются реакцией культуры смешанных лейкоцитов донора и реципиента. Перечисленные методы определяли в течение ряда лет дотрансплантационный иммунологический мониторинг и являлись основой для типирования совместимости доноров и реципиентов.

Гены класса I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) кодируют белки, которые являются неотъемлемой частью плазматической мембраны всех ядерных клеток. Белки класса I состоят из двух полипептидных единиц: варибельной тяжелой цепи, которая кодируется в рамках МНС, и неполиморфного пептида b2 — микроглобулина, который кодируется геном, расположенным за пределами МНС, и картирован на хромосоме 15. Пептиды образуются из внутриклеточных белков путем протеолитического расщепления большими многофункциональными протеазами, затем они перемещаются на поверхность клетки и прикрепляются к молекулам класса I, формируя пептидный антиген для цитотоксических Т-клеток [4].

Молекулы HLA I класса связывают пептиды длиной 8–10 аминокислот, фиксируя пептид по обеим сторонам молекулы. Молекулы HLA разных аллельных вариантов связывают пептиды с определенными аминокислотами в якорных позициях: первые С-концевые аминокислоты, 2-я и 5-я с N-конца. Важно отметить, что каждый конкретный аллельный вариант молекулы HLA связывает пептиды именно с этими, а не другими якорными молекулами [5].

Другой аллельный вариант МНС имеет химическое сродство к другим якорным аминокислотам.

Молекулы HLA I класса экспрессируются на всех ядро-содержащих клетках человека и связывают эндогенные пептиды, транспортируемые в эндоплазматический ретикулум (место синтеза МНС).

Молекулы HLA II класса экспрессируются только на антигенпрезентирующих клетках (В-клетки, дендритные клетки, макрофаги) и связывают пептиды экзогенного происхождения, которые попадают в клетки в результате эндоцитоза, и презентуют антиген для Т-клеточного рецептора (TCR) на CD4 Т-хелперах, обладающих сродством к молекулам HLA II класса [6].

Следует еще раз отметить, что каждый конкретный аллельный вариант молекулы HLA связывает определенные пептиды с определенными аминокислотами.

Набор аллелей HLA в различных локусах I и II классов в определенной хромосоме формирует гаплотип. Аллели — кодоминантны, так как каждый из родителей имеет два гаплотипа и экспрессирует их оба. Эти локусы расположены близко друг к другу, поэтому ребенку может передаваться гаплотип как единый блок, в связи с чем, ребенок и родитель имеют общий гаплотип, при этом шансы наследования двумя сибсами одного гаплотипа равны 25 %.

Общие принципы подбора доноров

Общие принципы подбора доноров освещены в работах [7, 8]. Совместимость по антигенам HLA считают определяющей при подборе донора.

В настоящее время идентифицировано 24 аллеля локуса HLA-A, 52 аллеля локуса HLA-B и 20 аллелей локуса HLA-DR. Комбинации генов могут быть крайне разнообразными, и совпадение одновременно во всех трех указанных локусах практически невозможно.

Отторжение в раннем послеоперационном периоде (в течение первого года после трансплантации) обычно связано с несовместимостью по HLA-DR, а в отдаленные сроки (в течение второго года) — по HLA-A и HLA-B. При полном совпадении HLA-A и HLA-B вероятность приживления донорской почки, например, в течение 2 лет составляет около 90 %, при совпадении наполовину — 65–85 % [1, 2].

Перекрестное типирование является очень важным исследованием при трансплантации органов и тканей. В присутствии комплемента проводят тестирование нескольких взятых в разное время проб сыворотки реципиента с лимфоцитами донора. Положительным считают результат, когда выявляют цитотоксичность сыворотки реципиента по отношению к лимфоцитам донора. Если хотя бы в одном случае перекрестного типирования выявлена гибель лимфоцитов донора, трансплантацию не проводят [1].

Подбор донора к реципиенту

В 1994 г. в клиническую практику широко внедрен метод перспективного генотипирования реципиентов «листа ожидания» и доноров. Селекция доноров — важная предпосылка для эффективности клинических

трансплантаций. «Лист ожидания» — сумма всей информации, характеризующей заданное количество реципиентов, из нее формируют банк информации [9].

В настоящее время в Европе действует несколько банков с данными о реципиентах (Евротрансплантат и др.) [1].

Для подбора донора при трансплантации солидных органов обычно достаточно типирования генов с низким разрешением, кроме случаев с особо чувствительными реципиентами в то время, как для трансплантации костного мозга, необходимо проводить генотипирование с высоким разрешением. В международных стандартах EFI [10] отмечено, что необходимым требованием при трансплантации от аллогенного донора является типирование генов HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-DRB1 на уровне высокого разрешения, которое представляет собой следующее:

- Определение всех HLA-аллелей, кодирующих одинаковую последовательность белка в антигенсвязывающем домене.
- HLA-аллели должны быть определены на уровне первого и второго поля в соответствии с номенклатурой B03.
- Для этого должны быть разрешены все неоднозначности в пределах 2 и 3 экзона для HLA I класса и 2 экзона для HLA II класса, включая нулевые аллели, имеющие полиморфизмы при отсутствии экспрессии кодируемого белка на клетке.

Установлено, что в пределах указанных регионов HLA-генов (2 и 3 экзон для HLA I класса и 2 экзон для HLA II класса) одну и ту же как белковую (группа «P»), так и нуклеотидную (группа «G») последовательность могут кодировать разные аллели.

Группа «P»

- включает HLA-аллели, кодирующие одну и ту же последовательность белка в антигенсвязывающих доменах (экзон 2 и 3 для аллелей HLA I класса и экзон 2 для аллелей HLA II класса)
- содержит четыре цифры, а буква «P» следует за первыми 2 полями аллеля с наименьшим номером в группе (A*01:01P).

Группа «G»

- включает HLA-аллели, имеющие идентичные нуклеотидные последовательности в пределах антигенсвязывающих доменов (экзон 2 и 3 для аллелей HLA I класса и экзон 2 для аллелей HLA II класса)
- содержит шесть цифр, а буква «G» следует за первыми 3 полями аллеля с наименьшим номером в группе (A*01:01:01G).

Состав групп «P» и «G», доступен на сайте международной ассоциации иммуногенетиков [11].

При появлении донора, у которого планируют изъятие органов, проводят его типирование по системам ABO и HLA, после чего выбирают, с каким реципиентом он наиболее совместим.

Несмотря на быстрое развитие методов во всех областях медицины и биологии, серологический метод (другое

название — цитотоксический тест) исследования до настоящего времени не претерпел каких-либо существенных изменений и основные его недостатки — субъективные элементы анализа — иногда не позволяют избежать ошибок при интерпретации результатов исследования.

Бурное развитие генетики привело к изменению методологии проведения дотрансплантационного иммунологического мониторинга, заменив его на более точные генетические методы исследования.

Методы типирования ДНК, применяемые в настоящее время при трансплантации органов и тканей

Комплементзависимая цитотоксичность

Принцип метода комплементзависимой цитотоксичности заключается в двухэтапном воздействии на лимфоциты периферической крови:

- на первом этапе — иммунной сыворотки, которая содержит антитела известной специфичности;
- на втором этапе — комплемента, при этом может быть использована сыворотка кролика или смесь сыворотки кролика и человека [12, 13].

Если лимфоциты, на поверхности которых находятся HLA-антигены, распознаются сывороткой, то происходит лизис этих лимфоцитов.

Количество лизирующихся таким образом лимфоцитов определяется с помощью проникновения в них прижизненного красителя. Этот метод имеет несколько модификаций, самым используемым из них является двухступенчатый метод, разработанный Национальным институтом здоровья (Бетезда, США) [12].

Метод и все его варианты основаны на использовании микротехники, предложенной американским исследователем П. Тераками и соавт. [14]. За более чем 60-летнее использование этого метода, произошли лишь незначительные изменения, заключающиеся в применении более современной техники (микроскопы, дозаторы и др.) и новой прижизненной окраски, в том числе redfix, в результате которой клетки фиксируются.

Метод полимеразной цепной реакции

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), предложенный Кари Маллисом, повысил чувствительность и специфичность анализа генов за счет амплификации участка ДНК, который требуется анализировать. Увеличение происходит за счет использования олигонуклеотидов, которые ограничивают интересующий участок ДНК [15].

Важнейшим моментом ПЦР является использование термостабильной ДНК-полимеразы и праймеров.

Термостабильная ДНК-полимераза катализирует реакцию синтеза ДНК, используя олигонуклеотидные праймеры как затравки, а исходную молекулу ДНК — в качестве матрицы для синтеза. В реакционную смесь добавляют также дезоксирибонуклеотиды: А, Т, G, С, из которых строятся цепи ДНК.

В более ранних работах демонстрировалась возможность амплификации HLA-DQA1 локуса и детекции ампликонов путем гибридизации с аллель-специфическими олигонуклеотидами и проявлением результатов гибридизации с помощью цветной реакции пероксидазы хрена с тетраметилбензидином, используя ДНК, выделенную из отдельной волосяной луковицы [16].

Выделение ДНК — это начальный этап проведения ПЦР.

В полученный для исследования материал (кровь, мазок из полости рта и т. д.) добавляются специальные растворы для удаления органических веществ с целью очистки ДНК. В результате остается ДНК или РНК, которые затем подвергаются амплификации.

ПЦР — это многократное копирование определенных фрагментов ДНК *in vitro* в процессе повторяющихся температурных циклов. Образование нуклеотидной цепи осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. Для начала работы ферменту необходима стартовая площадка, в качестве которой выступают «праймеры» (затравки) — синтетические олигонуклеотиды длиной 15–20 нуклеотидов. Праймеров должно быть два (прямой и обратный), они комплементарны участкам ДНК-матрицы, и именно фрагмент ДНК, ограниченный праймерами, будет многократно копироваться ДНК-полимеразой. Работа полимеразы заключается в последовательном добавлении нуклеотидов, комплементарных последовательности ДНК-матрицы. Тем самым в одном температурном цикле вновь синтезируются два новых фрагмента ДНК (т. к. молекула ДНК — двухцепочечная, то и матриц изначально две). Таким образом, за 25–35 циклов в пробирке накапливаются миллиарды копий участка ДНК, определенного праймерами. Структуру отдельного цикла можно представить следующим образом:

- 1) денатурация ДНК (плавление, расхождение цепей ДНК) — 95 °С, 1 или 2 мин;
- 2) отжиг праймеров (затравки связываются с ДНК-матрицей, температура данной стадии определяется нуклеотидным составом праймера) — 60 °С (к примеру), 1 мин;
- 3) элонгация ДНК (полимераза синтезирует цепь ДНК) — 72 °С, 1 мин (время зависит от длины синтезируемого фрагмента).

После окончания ПЦР продукт амплификации подвергается электрофорезу в агарозном геле с последующим окрашиванием, в результате молекулы ДНК разной длины разделяются пространственно (рис. 1). Полиакриламидный гель намного плотнее, поэтому больше подходит для разделения очень коротких фрагментов (несколько десятков пар нуклеотидов), при этом можно увидеть разницу даже в один нуклеотид [17].

На рис. 2 и 3 представлены электрофореграммы HLA-генов I класса А и В.

Еще раз необходимо подчеркнуть очень широкое разнообразие аллельных вариантов HLA-системы, в отличие

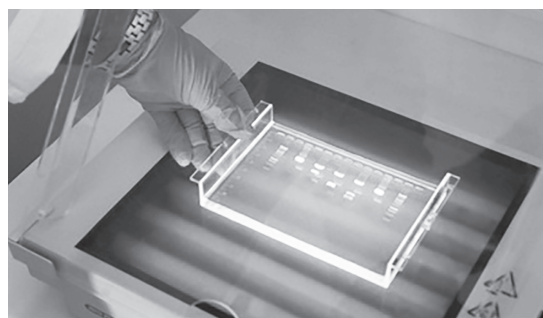


Рис. 1. Электрофорез в агарозном геле

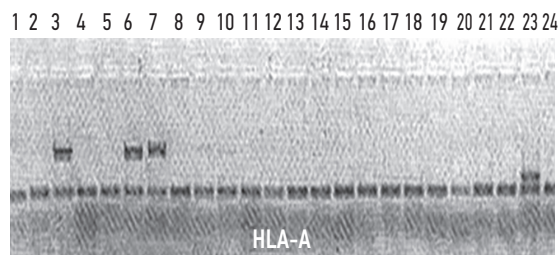


Рис. 2. Электрофореграмма HLA-генов 1-го класса А пациента реципиента из «списка ожидания» — для трансплантации почки

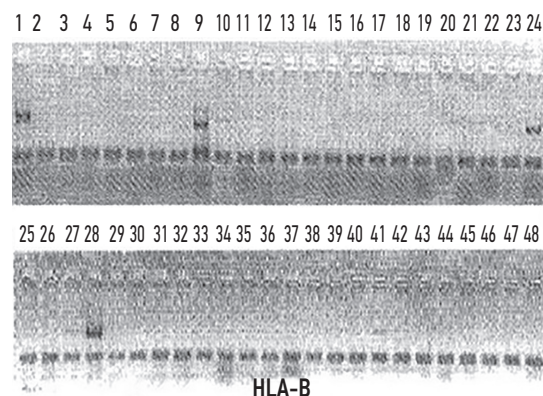


Рис. 3. Электрофореграмма HLA-генов 1-го класса В пациента

от других генов. В связи с этой особенностью нельзя создать наборы для ПЦР в реальном времени, так как возможно экранирование отдельных аллелей при регистрации флуоресцентных сигналов. Именно поэтому оценка результатов производится по конечной точке с помощью электрофореза [18]. Кроме того, гены главного комплекса гистосовместимости характеризуются очень высокой степенью кодоминантности, представляющей собой тип взаимодействия аллелей, при котором оба аллеля в полной мере проявляют свое действие. В результате фенотипический гибрид получает не усредненный вариант двух родительских признаков, а новый вариант, отличающийся от признаков обеих гомозигот [19].

SSP-, SBT-, SSO-технологии

Среди молекулярно-генетических методов различают технологии SSO (sequence specific oligonucleotides), SSP (sequence specific primers), SBT (sequence-based typing).

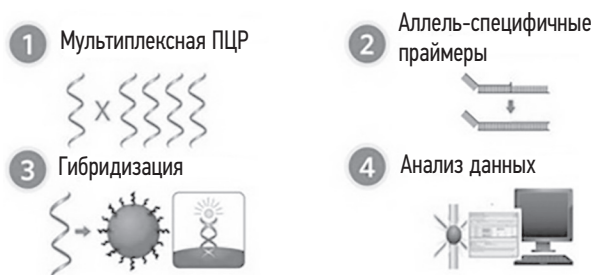


Рис. 4. Схема SSO-ПЦР

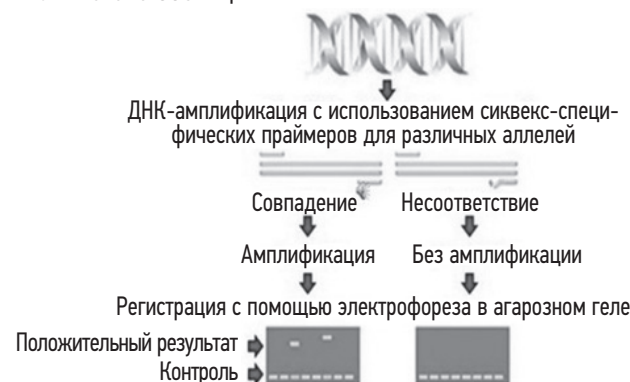


Рис. 5. Схема SSP-метода

Для технологии SSO характерны относительно низкая трудоемкость и высокая производительность, при этом выявляются точечные мутации генов HLA, т. е. эта методика обладает потенциалом технологии SBT [20, 21]. Именно эта технология чаще всего используется при формировании регистров доноров, что позволяет накопить данные о типировании десятков тысяч доноров [22].

SSO-метод типирования основан на амплификации геномной ДНК, за которой следуют гибридизация и анализ. Искомые специфичности улавливаются на этапе блот-гибридации, который, заменяет электрофорез в SSP технологии и представляет собой процесс связывания (конъюгацию) специфических участков ДНК с олигонуклеотидными зондами, пришитыми на специальные нейлоновые полоски — стрипы. Весь процесс блот-гибридации, окраски и интерпретации результатов полностью автоматизирован (2 часа) с помощью специального оборудования. Чипы после гибридизации анализируются на мультиплексном проточном анализаторе (например, Bio-Plex 3D). На рис. 4 представлены последовательные этапы SSO-метода.

Метод SSP представляет собой ПЦР с аллель-специфическими праймерами. Регистрация результатов амплификации проводится методом электрофореза в агарозном геле, при этом интерпретация результатов HLA-типирования очень простая — наличие или отсутствие продуктов ПЦР. При технологии SSP необходимые участки ДНК генов системы гистосовместимости улавливаются специфическими праймерами в ходе амплификации (рис. 5). Очень важное преимущество метода заключается в том, что типирование можно производить как на низком, так и на высоком уровне разрешения и характеризуется относительно небольшой стоимостью

оборудования для электрофореза. Основным недостатком — низкая производительность.

SBT-метод (секвенирование по Сэнгеру) позволяет получить первичную последовательность ДНК и имеет самую высокую разрешающую способность из выше представленных методов. Кроме того, применение SBT позволяет выявлять неизвестные, очень редкие аллели [23, 24]. Однако стоит признать, что оборудование и наборы реагентов для этого метода в настоящее время являются самыми дорогостоящими.

Следует отметить самый важный недостаток всех перечисленных методов исследования — выявление неоднозначных комбинаций нескольких пар аллелей. Наличие этого недостатка снижает эффективность HLA-типирования, так как внесение таких данных в базу не представляется возможным.

Метод таргетного секвенирования с использованием полногеномного секвенатора MiSeq

Преимущества таргетного секвенирования заключаются в следующем:

- позволяет сосредоточиться на конкретных участках генома или отдельных генах, именно поэтому анализировать результат гораздо удобнее;
- существенно снижает затраты (временные и денежные);
- благодаря глубокому секвенированию на различных уровнях можно получить информацию о редких отклонениях.

Кроме того, в отличие от секвенирования по Сэнгеру, методы полногеномного секвенирования (NGS) используют для глубокого (многократного) прочтения генетического материала, которое необходимо, например, для ресеквенирования и сборки новых геномов (*de novo*), транскриптомных и эпигеномных исследований [25].

Технология секвенирования MiSeq (*Illumina*, США) основана на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых нуклеотидов [26].

Общий принцип пробоподготовки для большинства современных (NGS) секвенаторов включает фрагментирование ДНК, привязку к субстрату, амплификацию фрагментов с помощью ПЦР и последующее считывание последовательности нуклеиновых кислот.

Суть метода заключается в следующем: к обоим концам предварительно фрагментированной ДНК лигируют адаптеры, необходимые для ПЦР и последующего секвенирования на молекулярных кластерах. Полученные ДНК-библиотеки иммобилизуют на поверхности проточной ячейки, где и проводят циклический процесс секвенирования.

Реакционная смесь для синтеза комплементарной ДНК подается на поверхность проточной ячейки и содержит ферменты, олигонуклеотиды, а также четыре типа флуоресцентно меченых дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. После включения в синтезируемую цепь ДНК нуклеотида-терминатора с помощью ПЗС-матрицы (специализированная

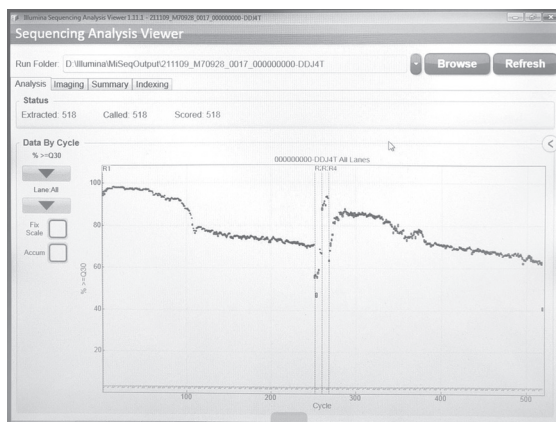


Рис. 6. Первичные результаты типирования генов HLA на секвенаторе MiSeq

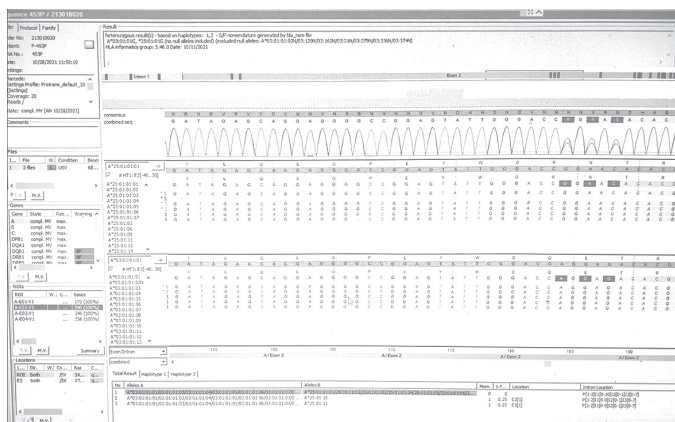


Рис. 7. Окончательные результаты типирования генов HLA при использовании целевой программы

аналоговая интегральная микросхема, состоящая из светочувствительных фотодиодов) идентифицируют как тип включенного нуклеотида, так и его положение. Затем терминирующая группа и флуоресцентная краска отщепляются от нуклеотида и цикл синтеза повторяется. Эта серия шагов продолжается определенное число раз, которое задает исследователь [27].

Примером практического применения целевого секвенирования в медицинских целях является HLA-типирование — секвенирование генов главного комплекса гистосовместимости, ответственных за распознавание организмом клеток по типу «свой–чужой». HLA-типирование проводят при трансплантации, патологии беременности, аутоиммунных заболеваниях и др. Целевое секвенирование на MiSeq, в отличие от других методов HLA, позволяет получить полную последовательность генов и точный генотип. На рис. 6 представлены первичные результаты типирования генов HLA на секвенаторе MiSeq. Окончательные результаты при использовании целевой программы показаны на рис. 7.

Описание технологии анализа с помощью геномного времяпролетного анализатора Massarray

Серия ранних работ, в которых для идентификации личности пробовали использовать локусы HLA-DQA1, являлась попыткой выявить однонуклеотидные замены (SNP) с помощью сорбированных на мембране аллель-специфических олигонуклеотидных проб. В набор входили 6 локусов, HLA DQA1, LDDDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC с разными числами аллелей для каждого [28], и его разрешающая способность была не очень большой. Набор использовался для криминалистических целей [29–31], и для анализа популяций в разных частях света.

В одной из работ для повышения достоверности результатов дот-блот-гибридизации исследуемой ДНК с аллель-специфическими олигонуклеотидами предлагалось

добавлять расщепление ампликонов подходящими рестрикционными эндонуклеазами [33].

Перечисленные исследования явились основой для разработки принципиально новой системы исследования индивидуальных генетических особенностей человека на основе однонуклеотидных полиморфизмов.

Одним из основных приложений данного аппаратного комплекса является идентификация личности человека по ДНК. Геномный масс-спектрометр анализирует нуклеотидные полиморфизмы SNP, сугубо индивидуальные для каждого человека. Система MassArray составляет генетический профиль (индивидуальный генетический паспорт). Анализ для этого проводится один раз в жизни и представляет собой совершенно достоверную информацию. Генетический паспорт позволяет идентифицировать человека по любому биологическому материалу. На сегодняшний день данная технология является самой точной и чувствительной. Точность обусловлена высокой разрешающей способностью масс-спектрометрического метода детекции. Чувствительность позволяет произвести анализ даже одной копии ДНК, находящейся в лунке спектрального чипа. Система является открытой. Российскими учеными разработана панель по идентификации человека. Метод позволяет осуществлять идентификацию по фрагментам нуклеиновых кислот. Преимущество метода заключается в возможности применения небольшого (вплоть до наногрaмм) количества анализируемого биологического материала, даже в виде обгорелых костей и деградированных тканей, в отличие от метода идентификации по STR. Метод идентификации (ID MassArray по SNP) применяется во всем мире и вытесняет метод идентификации по STR [34].

Технология анализа основана на амплификации уникальных областей идентификации личности, затем следует стадия добавочного праймера, в ходе которой получают ампликоны аллель-специфической ПЦР. Они являются аналитом для дальнейшего масс-спектрометрического анализа. В отличие от традиционной ПЦР в реальном



Рис. 8. Секвенер Massarray во время проведения исследования

времени, геномный масс-спектрометрический анализ осуществляет одновременную оценку нескольких десятков SNP в одной лунке, учитывает такие количественные факторы, как аллельность и зиготность, позволяет определять химерные и редкие формы наследования (в отличие от метода STR) [35–37]. На рис. 8 изображен секвенер Massarray в момент проведения анализа.

В Институте биохимии и генетики — обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, подобрана панель преимущественно биаллельных SNP (в нее также включены отдельные три- и тетрааллельные SNP) с высоким уровнем гетерозиготности, характерной для разных популяций всего мира, с целью ДНК-паспортизации всего населения Российской Федерации. Проведенный *in silico* анализ данной панели сипов по доступной базе данных секвенированных геномов людей во всем мире показал абсолютную достаточность 70 сипов для однозначной ДНК-идентификации личности. Разработанный способ представления данных о ДНК каждого человека обладает максимально возможной степенью цифровизации применительно к SNP как к ДНК-характеристике любого индивида. Благодаря этому база данных по ним будет иметь минимально возможный объем и обеспечивать максимально быстрый поиск с выдачей конкретных результатов о человеке, которому принадлежит анализируемый образец ДНК, если информация о таковом будет находиться в этой базе данных. Цифровизация результатов с минимальным объемом важна и для создания базы данных банка доноров для трансплантации органов и тканей.

Уникальность легшего в основу такой базы данных подхода заключается в том, что любой SNP рассматривается как потенциально тетрааллельный, что предупреждает случаи, когда у какого-нибудь индивида в определенном SNP будет находиться нуклеотид, неожиданный и считающийся биаллельным, и базы данных, принимающие в расчет только биаллельность SNP, окажутся неспособными справиться с такой ситуацией и будут выдавать ошибку [37, 38].

Себестоимость генетического анализа методом геномной масс-спектрометрии складывается из стоимости чипов (спектральной подложки), стоимости праймеров (стандартный набор) или стоимости обычных ПЦП реагентов при отказе от готовых реагентов компании *Agena Bioscience*. Открытость системы позволяет использовать реагенты для ПЦП других производителей.

Таким образом, подводя итог, необходимо отметить, что SNP обладают преимуществами по всем параметрам, кроме уровня полиморфизма. Однако следует иметь в виду, что у SNP полиморфизм имеет фиксированные границы в виде четырех нуклеотидов в вариабельном месте SNP и 10 комбинаций аллелей в популяциях, тогда как любой STR-, а тем более любой VNTR-локус, фактически безграничен по своему полиморфизму [39]. Это оказывается крайне неудобным для цифровизации, которая необходима для хранения полученных данных по каждому человеку в отдельности и по всему человечеству в целом.

ВЫВОДЫ

Типирование генов системы HLA, основанное на анализе ДНК, становится самым популярным из методов, используемых при трансплантации органов и тканей, так как имеет неоспоримые преимущества по сравнению с серологическими и цитологическими методами [36].

Метод ПЦП-SSP может быть использован для типирования небольшой группы пациентов и дает достаточно хорошие результаты, однако при этом требует больших временных затрат [36, 38].

В качестве дополнительного к ПЦП-SSP метода, в том случае, когда нельзя разделить аллели, используют метод ПЦП-SBT при наличии секвенатора в лаборатории.

Для лабораторий, в которых необходимо исследовать большие группы пациентов, удобнее использовать метод ПЦП-SSO.

Быстро возрастающее количество вновь идентифицированных аллелей подтверждает, что новые аллели появляются, как правило, благодаря генной инверсии, которая имеет место между различными аллелями в одном локусе.

Метод SBT позволяет избежать трудностей методов SSP и SSO, в том числе выявить очень редкие и неизвестные аллели, но при этом, однако, очень трудоемкий и пока еще дорогостоящий, поэтому не может широко использоваться в клинической практике [24].

Метод HLA-типирования с использованием секвенатора нового поколения MiSeq при необходимости создания банков доноров или пуповинной крови, где требуется исследовать большие группы образцов, дает хорошие результаты, менее трудоемкий и дорогостоящий по сравнению с секвенированием по Сенгеру.

Использование секвенатора Massarray для HLA-типирования основано на определении SNP, т. е.

однонуклеотидных замен, которыми отличаются индивидуальны геномы. С помощью этого прибора можно изучать как большие группы лиц, так и небольшие выборки при сохранении очень высокой точности и относительно не очень высокой цены [39].

Показано, что эпитопы HLA на донорской ДНК имеют большое значение для трансплантации солидных органов и которые можно определить только с помощью типирования с высоким разрешением, анализ которого, как правило, невозможно выполнить на материале умершего донора. В недавно появившейся публикации [40] разработан метод быстрого NGS HLA-типирования с высоким уровнем разрешением для умерших доноров. Он основан на сокращении времени амплификации ПЦР, кроме того, использована платформа для секвенирования одиночных молекул Oxford Nanopore на проточной кювете Flongle. Метод ONT-Rapid HR HLA опробован на 42 образцах. Типирование с высоким уровнем разрешения методом ONT-Rapid HR HLA на 100 % совпало как с результатами метода SSO, так и NGS. При этом новый метод позволил провести типирование по всем локусам за 4–4,5 часа. ONT-Rapid HR — это первый зарегистрированный

метод HLA-типирования NGS, использованный для анализа ДНК умерших доноров. Возможность обеспечить HLA-типирование с высоким уровнем разрешением у умерших доноров перед имплантацией позволит в будущем рассмотреть вопрос о сопоставлении эпитопов, что в итоге принесет клинические преимущества пациентам.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова».

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Руководящие принципы ВОЗ по трансплантации человеческих клеток, тканей и органов. Доступно по: https://www.who.int/transplantation/Guiding_PrinciplesTransplantation_WHA63.22ru.pdf (дата обращения 07.05.2021).
2. Руководство по диагностическому лабораторному обеспечению трансплантации солидных органов: практическое руководство. Пер. с англ. М.: Биохиммак, 2013. 16 с.
3. Гордеева Л.А., Шабалдин А.В., Глушков А.Н. Влияние неуполученных родительских HLA на иммунный ответ у потомства // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5–6. С. 587–596.
4. Янкевич Т. Разработка системы типирования генов HLA I и II классов на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования (NGS). Дис. канд. мед. наук. М.: Институт иммунологии ФМБА России, 2018.
5. Бондарева М.Н. HLA (класс II) и естественный отбор. «Функциональный» генотип, гипотеза преимущества «функциональной» гетерозиготности. Дис. докт. мед. наук. М.: Институт иммунологии ФМБА России, 2007.
6. Будчанов Ю.И. Клеточный иммунитет. Типы клеточной цитотоксичности. Рецепторы и маркеры, субпопуляции лимфоцитов: учебно-методическое пособие по общей иммунологии. Тверь, 2008. 11 с.
7. Колюбаева С.Н., Горичный В.А., Протасов О.В., и др. Методы HLA-типирования, используемые для трансплантации органов и тканей // Вестник Военно-инновационного технополиса «ЭРА». 2021. Т. 2, № 1. С. 21–30.
8. Временные методические рекомендации, регламентирующие HLA-типирование доноров костного мозга/гемопоэтических стволовых клеток и взаимодействие регистров доноров костного мозга / под ред. В.Г. Савченко. М.: ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» МЗ РФ, 2021. 34 с.
9. Формирование и ведение листа ожидания трансплантации трупного органа. Алгоритм подбора оптимальной пары донор–реципиент. Национальные клинические рекомендации. М.: Российское трансплантологическое общество, 2015. 33 с.
10. European Federation for Immunogenetics. Standards for histocompatibility & immunogenetics testing (Version 8.0). 2020. 40 p. Available at: https://efi-web.org/fileadmin/Efi_web/Standardv8_280819.pdf (accessed 05.05.2021).
11. EFI-web. Standards for Histocompatibility & Immunogenetics testing. Available at: <https://efi-web.org/committees/standards-committee> (accessed 05.05.2021).
12. Зарецкая Ю.М. Клиническая иммуногенетика. М.: Медицина, 1983. 208 с.
13. Тутер Е.А. Общие принципы изучения специфической активности лекарственных препаратов моноклональных антител в доклинических исследованиях как базовый показатель их биологической аналогичности. Дис. канд. биол. наук. Волгоград, 2017.
14. Mittal K.K., Mickey M.R., Singal D.P., Terasaki P.I. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test // Transplantation. 1968. Vol. 6, No. 8. P. 913–927.
15. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР). Методическое пособие. М.: ДНК Технология, 2012. 151 с.
16. Higuchi R., Von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A. DNA typing from single hairs // Nature. 1988. Vol. 332, No. 6164. P. 543–546.
17. Milbury C.A., Li J., Liu P., Makrigiorgos G.M. COLD-PCR: improving the sensitivity of molecular diagnostics assays // Expert. Rev. 2011. Vol. 11. P. 159–169.

18. Granados D.P., Sriranganadane D., Daouda T., et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides // *Nature Communications*. 2014. Vol. 5, No. 1. P. 1–14.
19. Клаг У.С., Каммингс М.Р., Спенсер Ш.А., и др. Основы генетики. Пер. с англ. Лушникова А.А., Мусаткина С.М. М.: Техносфера, 2016. 944 с.
20. Логинова М.А., Трофимова Н.П., Парамонов И.В. Трофимова Н.П., Парамонов И.В. Анализ частоты выявления неоднозначностей локусов при проведении HLA-типирования по технологии SSO // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012. Т. 4. С. 29–32.
21. Madden K., Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory // *Virchows Arch*. 2019. Vol. 474, No. 2. P. 139–147. DOI: 10.1007/s00428-018-2501-3
22. Cargou M., Ralazamahaleo M., Blouin L., et al. Improvement in HLA-C typing by a new sequence-specific oligonucleotides kit // *HLA*. 2020. Vol. 96, No. 3. P. 323–328. DOI: 10.1111/tan.13986
23. ПРОТРАНС версия RU03 S4-S1: руководство пользователя. Protrans medizinische diagnostische Produkte, 2015. 36 с.
24. Kaur N., Pinelli D., Kransdorf E.P., et al. A blueprint for electronic utilization of ambiguous molecular HLA typing data in organ allocation systems and virtual crossmatch // *Hum. Immunol*. 2020. Vol. 81, No. 1–3. P. 65–72. DOI: 10.1016/j.humimm.2020.01.007
25. Бархатов И.М., Предеус А.В., Чухловин А.Б. Секвенирование нового поколения и области его применения в онкогематологии // *Онкогематология*. 2016. Т. 11, № 4. С. 56–63.
26. Illumina. Nextera XT Library Prep: Tips and Troubleshooting. Available at: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/nextera-xt-troubleshooting-technical-note.pdf> (accessed 01.05.2021).
27. NGS высокопроизводительное секвенирование / под ред. Д.В. Ребрикова. М.: Бином, 2014. 231 с.
28. Gross A.M., Guerrieri R.A. HLA DQA1 and Polymarker validations for forensic casework: standard specimens, reproducibility, and mixed specimens // *J. Forensic Sci*. 1996. Vol. 41, No. 6. P. 1022–1026. DOI 10.1520/JFS14041J
29. Kubo S., Fujita Y., Yoshida Y., et al. Personal identification from skeletal remain by D1S80, HLA DQA1, TH01 and polymarker analysis // *J. Med. Invest*. 2002. Vol. 49, No. 1–2. P. 83–86.
30. Harrington C.S., Dunaiski V., Williams K.E., Fowler C. HLA DQA typing of forensic specimens by amplification restriction fragment polymorphism (ARFP) analysis // *J. Forensic Sci*. 1991. Vol. 51, No. 1. P. 147–157.
31. Wang Y., Xiao J., Yang S., Zhang X. Second harmonic generation spectroscopy on two-dimensional materials // *Optical Materials Express*. 2019. Vol. 9, No. 3. P. 1136–1149. DOI: 10.1364/OME.9.001136
32. Чемерис Д.А., Сагитов А.М., Аминов Ф.Г., и др. Эволюция подходов к ДНК-идентификации личности // *Биомика*. 2018. Т. 10, № 1. С. 85–140.
33. Bowes J., Thyberg J., Dahlstrom O., et al. Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort // *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2012. Vol. 71, No. 8. P. 1350–1354. DOI:10.1136/annrheumdis-2011-200802
34. Nakka P., Raphael B.J., Ramachandran S. Gene and network analysis of common variants reveals novel associations in multiple complex diseases // *Genetics*. 2016. Vol. 204. P. 783–798.
35. Edgerly C.H., Weimer E.T. The Past, Present, and Future of HLA Typing in Transplantation // *Methods Mol Biol*. 2018. Vol. 1802. P. 1–10. DOI: 10.1007/978-1-4939-8546-3_1
36. Technical Manual. American Association of blood banks: 13th edition. Bethesda, Maryland, 2001. P. 114–125.
37. Dimo-Simonin N., Brandt- Casadevall C. Evaluation and usefulness of reverse dot blot DNA PolyMarker typing in forensic case work // *J. Forensic Sci*. 1996. Vol. 81, No. 1. P. 61–72.
38. Argani H. Anti-HLA Antibody: The Role of Epitopes in Organ Transplantation // *Exp. Clin. Transplant*. 2019. Vol. 17. P. 38–42. DOI: 10.6002/ect.MESOT2018. L41
39. Duke J.L., Mosbrugger T.L., Ferriola D., et al. Resolving MiSeq-generated ambiguities in HLA-DPB1 typing by using the Oxford Nanopore technology // *J. Mol. Diagn*. 2019. Vol. 21, No. 5. P. 852–861. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.04.009
40. De Santis D., Truong L., Martinez P., et al. Rapid high resolution HLA genotyping by MinION Oxford nanopore sequencing for deceased donor organ allocation // *HLA*. 2020. Vol. 96, No. 2. P. 141–162. DOI: 10.1111/tan.13901

REFERENCES

1. World Health Organization. *WHO guidelines on transplantation of human cells, tissues, and organs*. Available at: https://www.who.int/transplantation/Guiding_PrinciplesTransplantation_WHA63.22ru.pdf (accessed 07.05.2021). (In Russ.)
2. *Guidelines for diagnostic laboratory management of solid organ transplantation: a practical guide*. Translation from English. Moscow: Biokhimmak Publisher; 2013. 16 p. (In Russ.)
3. Gordeeva LA, Shabaldin AV, Glushkov AN. Influence of non-inherited parental HLA on the immune response in offspring. *Meditsinskaya immunologiya*. 2006;8(5–6):587–596. (In Russ.)
4. Yankevich T. *Development of a typing system for HLA classes I and II genes at a high resolution using high-throughput sequencing (NGS)*. Ph.D. (Medicine) thesis. Moscow: Institute of Immunology FMBA of Russia Publishing House; 2018. (In Russ.)
5. Bondareva MN. *HLA (class II) and natural selection. "Functional" genotype, hypothesis of the advantage of "functional" heterozygosity*. D.Sc. (Medicine) thesis. Moscow: Institute of Immunology, FMBA of Russia Publishing House; 2007. (In Russ.)
6. Budchanov Yul. *Cellular immunity. Types of cellular cytotoxicity. Receptors and markers, lymphocyte subpopulations: a teaching aid in general immunology*. Tver; 2008. 11 p. (In Russ.)
7. Kolyubaeva SN, Gorichny VA, Protasov OV, et al. HLA-typing methods used for organ and tissue transplantation. *Bulletin of the Military Innovative Technopolis "ERA"*. 2021;2(1):21–30. (In Russ.)
8. Savchenko VG, ed. *Temporary guidelines regulating HLA typing of bone marrow/hematopoietic stem cells donors and interaction of bone marrow donor registries*. Moscow: Federal State Budgetary Institution "National Medical Research Center of Hematology" Ministry of Health of the Russian Federation Publishing House; 2021. 34 p. (In Russ.)
9. *Formation and maintenance of a waiting list for transplantation of a cadaveric organ. Algorithm for selecting the optimal donor-re-*

recipient pair. National clinical guidelines. Moscow: Russian Transplant Society Publishing House; 2015. 33 p. (In Russ.)

10. European Federation for Immunogenetics. *Standards for histocompatibility & immunogenetics testing (Version 8.0)*. 2020. 40 p. Available at: https://efi-web.org/fileadmin/Efi_web/Standardv8_280819.pdf (accessed 05.05.2021).

11. EFI-web. *Standards for Histocompatibility & Immunogenetics testing*. Available at: <https://efi-web.org/committees/standards-committee> (accessed 05.05.2021).

12. Zaretskaya YuM. *Clinical immunogenetics*. M.: Meditsina Publisher; 1983. 208 p. (In Russ.)

13. Touter EA. *General principles for studying the specific activity of monoclonal antibodies in preclinical studies as a basic indicator of their biological similarity*. Ph.D. (Biology) thesis. Volgograd; 2017. (In Russ.)

14. Mittal KK, Mickey MR, Singal DP, Terasaki PI. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation*. 1968;6(8):913–927.

15. *Basics of polymerase chain reaction (PCR)*. Methodological manual. Moscow: DNA Technology Publisher; 2012. 151 p. (In Russ.)

16. Higuchi R, Von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature*. 1988;332(6164):543–546.

17. Milbury CA, Li J, Liu P, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: improving the sensitivity of molecular diagnostics assays. *Expert. Rev*. 2011;11:159–169.

18. Granados DP, Sriranganadane D, Daouda T, et al. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nature Communications*. 2014;5(1):1–14.

19. Clag US, Cummings MR, Spencer ShA, et al. Fundamentals of genetics. Lushnikova A.A., Musatkina S.M., translation from English. Moscow: Tekhnosfera Publisher; 2016. 944 p.

20. Loginova MA, Trofimova NP, Paramonov IV, Trofimova NP, Paramonov IV. Analysis of the frequency of detecting ambiguities of loci during HLA typing using the SSO technology. *Clinical laboratory diagnostics*. 2012;4:29–32. (In Russ.)

21. Madden K, Chabot-Richards D. HLA testing in the molecular diagnostic laboratory. *Virchows Arch*. 2019;474(2):139–147. DOI: 10.1007/s00428-018-2501-3

22. Cargou M, Ralazamahaleo M, Blouin L, et al. Improvement in HLA-C typing by a new sequence-specific oligonucleotides kit. *HLA*. 2020;96(3):323–328. DOI: 10.1111/tan.13986

23. *PROTRANS version RU03 S4-S1: user manual*. Protrans medizinische diagnostische Produkte; 2015. 36 p.

24. Kaur N, Pinelli D, Kransdorf EP, et al. A blueprint for electronic utilization of ambiguous molecular HLA typing data in organ allocation systems and virtual crossmatch. *Hum Immunol*. 2020;81(1–3):65–72. DOI: 10.1016/j.humimm.2020.01.007

25. Barkhatov IM, Predeus AV, Chukhlov AB. Sequencing of a new generation and its application in oncohematology. *Oncohematology*. 2016;11(4):56–63. (In Russ.)

26. Illumina. *Nextera XT Library Prep: Tips and Troubleshooting*. Available at: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/nextera-xt-troubleshooting-technical-note.pdf> (accessed 01.05.2021).

27. Rebrikov DV, ed. *NGS high throughput sequencing*. Moscow: Binom Publisher; 2014. 231 p. (In Russ.)

28. Gross AM, Guerrieri RA. HLA DQA1 and Polymarker validations for forensic casework: standard specimens, reproducibility, and mixed specimens. *J Forensic Sci*. 1996;41(6):1022–1026. DOI: 10.1520/JFS14041J

29. Kubo S, Fujita Y, Yoshida Y, et al. Personal identification from skeletal remain by D1S80, HLA DQA1, TH01 and polymarker analysis. *J Med Invest*. 2002;49(1–2):83–86.

30. Harrington CS, Dunaiski V, Williams KE, Fowler C. HLA DQα typing of forensic specimens by amplification restriction fragment polymorphism (ARFP) analysis. *J. Forensic Sci*. 1991;51(1):147–157.

31. Wang Y, Xiao J, Yang S, Zhang X. Second harmonic generation spectroscopy on two-dimensional materials. *Optical Materials Express*. 2019;9(3):1136–1149. DOI: 10.1364/OME.9.001136

32. Chemeris DA, Sagitov AM, Aminev FG, et al. Evolution of approaches to DNA identification of a person. *Biomics*. 2018;10(1):85–140. (In Russ.)

33. Bowes J, Thyberg J, Dahlstrom O, et al. Comprehensive assessment of rheumatoid arthritis susceptibility loci in a large psoriatic arthritis cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2012;71(8):1350–1354. DOI:10.1136/annrheumdis-2011-200802

34. Nakka P, Raphael BJ, Ramachandran S. Gene and network analysis of common variants reveals novel associations in multiple complex diseases. *Genetics*. 2016;204:783–798.

35. Edgerly CH, Weimer ET. The Past, Present, and Future of HLA Typing in Transplantation. *Methods Mol Biol*. 2018;1802:1–10. DOI: 10.1007/978-1-4939-8546-3_1

36. Technical Manual. *American Association of blood banks*: 13th edition. Bethesda, Maryland; 2001:114–125.

37. Dimo-Simonin N, Brandt- Casadevall C. Evaluation and usefulness of reverse dot blot DNA PolyMarker typing in forensic case work. *J Forensic Sci*. 1996;81(1):61–72.

38. Argani H. Anti-HLA Antibody: the role of epitopes in organ transplantation. *Exp Clin Transplant*. 2019;17:38–42. DOI: 10.6002/ect. MESOT2018. L41

39. Duke JL, Mosbrugger TL, Ferriola D, et al. Resolving MiSeq-generated ambiguities in HLA-DPB1 typing by using the Oxford Nanopore technology. *J Mol Diagn*. 2019;21(5):852–861. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2019.04.009

40. De Santis D, Truong L, Martinez P, et al. Rapid high resolution HLA genotyping by MinION Oxford nanopore sequencing for deceased donor organ allocation. *HLA*. 2020;96(2):141–162. DOI: 10.1111/tan.13901

ОБ АВТОРАХ

*Светлана Николаевна Колюбаева, докт. биол. наук; адрес: 194044, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ORCID: <https://0000-0003-2441-9394>; eLibrary SPIN: 2077-2557; Author ID: 759158; e-mail: ksnwma@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

AUTHORS' INFO

*Svetlana N. Kolyubaeva, D.Sc. (Biology); address: 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russia, 194044; ORCID: <https://0000-0003-2441-9394>; eLibrary SPIN: 2077-2557; Author ID: 759158; e-mail: ksnwma@mail.ru

ОБ АВТОРАХ

Лилия Анатольевна Мякошина;

ORCID: <https://0000-0002-2498-6201>; eLibrary SPIN: 4221-2997;
Author ID: 992455; e-mail: lmyakoshina@yandex.ru

Марина Ивановна Елисеева;

ORCID: <https://0000-0001-7731-7661>; eLibrary SPIN: 9616-2169;
Author ID: 878867; Researcher ID: L-3769-2016;
e-mail: eliceewa@yandex.ru

Руслан Иванович Глушаков, докт. мед. наук;

ORCID: <https://0000-0002-0161-5977>; eLibrary SPIN: 6860-8990;
Author ID: 621995; e-mail: Glushakovruslan@gmail.com

AUTHORS' INFO

Liliya A. Myakoshina;

ORCID: <https://0000-0002-2498-6201>; eLibrary SPIN: 4221-2997;
Author ID: 992455; e-mail: lmyakoshina@yandex.ru

Marina I. Eliseeva;

ORCID: <https://0000-0001-7731-7661>; eLibrary SPIN: 9616-2169;
Author ID: 878867; Researcher ID: L-3769-2016;
e-mail: eliceewa@yandex.ru

Ruslan I. Glushakov, M.D., D.Sc. (Medicine);

ORCID: <https://0000-0002-0161-5977>; eLibrary SPIN: 6860-8990;
Author ID: 621995; e-mail: Glushakovruslan@gmail.com