

Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями

Н.В. Минеева, С.В. Гавровская, И.И. Кробинец, И.А. Пашкова, Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева

ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург

Контакты: Светлана Викторовна Гавровская mousetoon@mail.ru

Наличие в анамнезе у больных гематологическими заболеваниями многократных трансфузий повышает вероятность их сенсibilизации к антигенам форменных элементов крови доноров и развития иммунологических осложнений. Цель работы заключалась в оценке частоты встречаемости аллоантител у данной категории лиц. Исследования по выявлению аллоантител к антигенам эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов проводили у пациентов с апластической анемией, острым лейкозом, лимфолейкозом, аутоиммунной тромбоцитопенией. Полученные результаты обследования 9696 больных показали, что частота выявляемости аллоантител к антигенам эритроцитов составила 3,8 %, при этом в 0,9 % случаев антитела принадлежали к классу иммуноглобулинов IgG, а в 2,9 % случаев были представлены иммуноглобулинами класса IgM. Анализ специфичности выявленных антиэритроцитарных аллоантител класса IgG показал, что наиболее часто у больных в сыворотке присутствовали моноспецифические анти-D антитела (21 случай), анти-DC и DE антитела (4 случая), анти-C (8), анти-E (15), анти-c (13), анти-K (11). Реже выявлялись антитела анти-e (1), анти-Fy^a (2), анти-Le^a (4), анти-S (2), анти-s (2), анти-Jk^a (2). Аллоантитела к гранулоцитам были обнаружены у 66,7 % из 384 пациентов, при этом результаты выявляемости зависели от метода исследования. На наличие антитромбоцитарных аллоантител исследовались 285 образцов сывороток больных, из которых аллоантитела присутствовали у 99 человек, что составило 34,7 % случаев. Специфичность аллоантител к антигенам тромбоцитов была определена только в 3 образцах сывороток: анти-2b, -1a, -1b. У остальных больных, вероятно, присутствовали антитела к нескольким антигенам одновременно, поэтому идентифицировать их не представлялось возможным.

Ключевые слова: сенсibilизация, аллоантитела, антигены, специфичность

Frequency of red cell, leukocytic and platelet alloantibodies in patients with hematological diseases

N.V. Mineeva, S.V. Gavrovskaya, I.I. Krobinec, I.A. Pashkova, N.N. Bodrova, E.A. Sysoeva

Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, Saint Petersburg

History of multiple transfusions in patients with hematological diseases increases the likelihood of immunization to donor blood cells antigens and immunological complications development. Incidence of alloantibodies development in this patients was assessed in this work. Alloantibodies detection was performed in patients with aplastic anemia, acute leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and autoimmune thrombocytopenia. 9696 patients were included in this study. Frequency of alloantibodies to red cell antigens was 3.8 %, with 0.9 % of the antibody belong to the immunoglobulin G, and 2.9 % of the cases – to immunoglobulin M. Most of the IgG antibodies had following specificity: monospecific anti-D antibody (21 cases), anti-DC and anti-DE antibodies (4 cases), anti-C (8 cases), anti-E (15), anti-c (13), and anti-K (11). Anti-e (1), anti-Fy^a (2), anti-Le^a (4), anti-S (2), anti-s (2), anti-Jk^a (2) antibodies were less common. Granulocytes antibodies were found in 66.7 % of 384 patients, with results dependent on the detection method used. The presence of antiplatelet alloantibodies studied in 285 serum samples, of which antibodies were detected in 99 patients (34.7 %). Specificity of platelet antibodies was determined in three serum samples only: anti-2b, anti-1a, anti-1b. In other patients, probably present antibodies to several antigens simultaneously, and to identify them was not possible.

Key words: immunization, alloantibodies, antigens, specificity

Введение

Гемокомпонентная терапия широко используется при лечении больных гематологическими заболеваниями и может сопровождаться развитием сенсibilизации к антигенам, представленным на клетках крови. Кроме антител к антигенам эритроцитов у больных обнаруживают антитела к лейкоцитам и тромбоцитам. Антитела к антигенам форменных элементов крови чаще вырабатываются у реципиентов, имеющих в анамнезе многократные трансфузии цельной крови и компонентов, так как при этом по-

вышается вероятность получения антигена, отсутствующего у реципиента, и возникновения иммунного ответа [1, 2].

Наиболее изучена у реципиентов частота встречаемости антител к антигенам эритроцитов, которая в среднем составляет 1–3,8 %. Однако по данным литературы процент сенсibilизированных после гемотрансфузий реципиентов может быть гораздо выше, и зависит от пола, возраста, категории обследуемой группы (больные, получающие гемотрансфузии периодически в течение жизни; реципиенты крови, не име-

ющие хронической патологии; акушерские пациентки и др.), наличия и характера заболеваний, а также от типа и трансфузиологической активности лечебно-го учреждения [3].

Большинство исследователей указывают на прямую связь между количеством трансфузий и степенью аллоиммунизации к антигенам эритроцитов. Так, частота встречаемости аллоантител у онкогематологических больных, имеющих в анамнезе менее 50 гемотрансфузий, составляет 7 %, при дальнейшем увеличении числа гемотрансфузий количество сенсibilизированных лиц возрастает до 30 % [3, 4].

Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов и лейкоцитов при проведении гемотрансфузий — факт известный. Меньше данных представлено относительно выработки антител к антигенам гранулоцитов и тромбоцитов. Тромбоциты на своей поверхности содержат антигены многих систем: эритроцитарных, главного комплекса гистосовместимости HLA (Human Leukocyte Antigen) и собственно тромбоцитарных HPA (Human Platelet Antigen). По данным зарубежных авторов, HPA-антитела наблюдаются с частотой от 8 до 25 % и обычно сочетаются с наличием у реципиента HLA-антител. Иногда антитела к антигенам тромбоцитов вырабатываются без одновременного образования антител к лейкоцитам. Так, было замечено, что при трансфузиях тромбоцитов, совместимых по антигенам системы HLA, у 20–25 % больных вырабатываются специфические антитела против антигенов тромбоцитов, вызывающие в дальнейшем рефрактерность к трансфузиям [5–7].

Показано, что 3,8 % реципиентов с миелодиспластическим синдромом имеют антитела к антигенам тромбоцитов [4]. У больных талассемией, которым проводили трансфузии с 2–4-недельными интервалами, процент сенсibilизированных лиц, имеющих антитела к тромбоцитам, был выше и составил 56 % [8].

В последнее десятилетие установлена роль антител и антигенов гранулоцитов в развитии таких посттрансфузионных осложнений, как острая легочная недостаточность и нейтропения. Поэтому в настоящее время активно разрабатываются методы диагностики антигранулоцитарных аллоантител, а также изучается частота их встречаемости [9].

В отечественной литературе данные по аллосенсибилизации к антигенам форменных элементов крови у больных, получающих многократные трансфузии, малочисленны или отсутствуют. Таким образом, особенности аллосенсибилизации реципиентов к антигенам эритроцитов, тромбоцитов и гранулоцитов остаются недостаточно изученными.

Целью работы являлось исследование частоты аллосенсибилизации к антигенам форменных элементов крови у больных гематологическими заболеваниями.

Материалы и методы

Исследования по выявлению аллосенсибилизации проводили у больных гематологическими заболевани-

ями в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, г. Санкт-Петербург. Материалом исследования служили образцы крови больных, имеющих в анамнезе многократные трансфузии компонентов крови. Контролем служили образцы сывороток доноров-мужчин, не имеющих трансфузий в анамнезе. Наличие аллоантител к антигенам эритроцитов исследовали у 9696 больных, антител к лейкоцитам у 384 больных и антител к тромбоцитам у 285 больных с апластической анемией, острым лейкозом, лимфолейкозом, аутоиммунной тромбоцитопенией.

Выявление аллоантител к эритроцитам проводили методом агглютинации в геле на ID-картах, содержащих анти-IgG реактив, с использованием микротипирующей системы DiaMed GmbH (Швейцария) и тест-эритроцитов ID-DiaCell I–II–III (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России). Для определения принадлежности антител к классу иммуноглобулинов использовали ID-карты с NaCl (DiaMed GmbH, Швейцария). Антитела класса IgM разрушали унитиолом.

Выявление лейкоцитарных аллоантител проводили методом лейкоагглютинации и агглютинации в геле. Для исследования аллоантител использовали лейкоциты от 5 доноров, при этом заключение о наличии антител в сыворотке делали при положительной реакции хотя бы с одним образцом клеток. Для метода лейкоагглютинации использовали 2 мкл выделенных гранулоцитов доноров, и инкубировали их с 2 мкл сывороток больных в камерах Терасаки 1 ч при 37 °С. Наличие агглютинации оценивалось под микроскопом. Выявление гранулоцитарных аллоантител методом агглютинации в геле проводили в соответствии с описанной нами ранее методикой [10].

Выявление антитромбоцитарных аллоантител. Сыворотки анализировали методом твердофазной адгезии на плашках [11]. Для определения аллоантител на плашку наносили лизаты тромбоцитов доноров, типированных методом полимеразной цепной реакции по антигенам HPA-1a/1b, 2a/2b, 3a/3b, 4a/4b и HPA-5a/5b, а также сыворотку пациентов. Для визуализации реакции к смеси добавляли эритроциты, покрытые анти-IgG. Если в сыворотке имелись антитела, вступающие в реакцию с антигенами тромбоцитов, эритроциты распределялись по всей ячейке равномерно (положительный результат), если антител не было, эритроциты скатывались на дно и образовывали точечный осадок (отрицательный результат) [12]. Перед лизированием тромбоциты доноров предварительно обрабатывали лимонной кислотой или хлороквином для удаления HLA-антигенов [13].

Результаты

Выявление антиэритроцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями. В период 2005–2010 гг. скрининг антиэритроцитарных аллоантител проведен у 9696 больных. Аллоантитела различ-

ной специфичности были выявлены у 371 больного, результаты представлены в табл. 1. У 286 (2,9 %) больных выявленные антитела принадлежали к иммуноглобулинам класса М, они не выявлялись после обработки унитиолом и не имели специфичности к антигенам эритроцитов. У 85 (0,9 %) человек выявлены аллоантитела класса IgG, специфичность которых была установлена при идентификации с расширенной панелью тест-эритроцитов.

Анализ специфичности выявленных аллоантител класса IgG к антигенам эритроцитов показал, что наиболее часто у больных в сыворотке присутствовали моноспецифические анти-D антитела (21 случай), анти-DC и DE антитела (4 случая), анти-С (8 случаев), анти-Е (15), анти-с (13), анти-К (11). Реже выявлялись антитела анти-е (1), анти-Fy^a (2), анти-Le^a (4), анти-S (2), анти-s (2), анти-Jk^a (2).

Выявление аллоантител к гранулоцитам у больных гематологическими заболеваниями. На наличие антигранулоцитарных аллоантител были исследованы 384 образца сывороток больных. Результаты исследований антител методом лейкоагглютинации в микропланшетах и агглютинации в геле представлены в табл. 2.

В процессе исследования аллоантитела были выявлены у 256 из 384 обследованных, что составило

66,7 %. При этом результаты выявляемости антител зависели от метода исследования. Только в 53 образцах сывороток антитела выявлялись одновременно и реакцией лейкоагглютинации, и агглютинацией в геле (13,8 %); в 188 образцах сывороток – только гелевым методом (48,96 %); в 15 образцах – только лейкоагглютинацией (4,0 %). В 128 образцах сывороток антитела отсутствовали (33,3 %). Различия в выявляемости аллоантител методами лейкоагглютинации и агглютинации в геле, вероятно, связаны с чувствительностью примененных методов исследования в отношении принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов (IgM и IgG соответственно). Таким образом, исследование показало высокий процент наличия аллосенсибилизации к гранулоцитам у больных гематологическими заболеваниями.

Выявление антитромбоцитарных аллоантител у больных. Наличие антитромбоцитарных аллоантител было исследовано у 285 больных. В сыворотке 99 (34,7 %) больных были выявлены тромбоцитарные антитела. Результаты приведены в табл. 3.

В 3 образцах сывороток специфичность антител была установлена: анти-2b, -1a, -1b. В 4 случаях специфичность выводилась нечетко: анти-15a?, -15b?, -1a?, -2b?. В 92 (32,3 %) образцах специфичность ан-

Таблица 1. Специфичность антиэритроцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями

Количество сенсibilизированных лиц	Число больных, имеющих антитела класса IgM	Число больных, имеющих антитела класса IgG												
		Анти-D	Анти-DC, -DE	Анти-С	Анти-с	Анти-Е	Анти-е	Анти-К	Анти-Fy ^a	Анти-Le ^a	Анти-S	Анти-s	Анти-Jk ^a	
371	286	85												
		21	4	8	13	15	1	11	2	4	2	2	2	

Таблица 2. Выявляемость антигранулоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями

Результаты исследования образцов сывороток	Количество	Проценты
Образцы, в которых антитела выявлены и гелевым методом, и методом лейкоагглютинации	53	13,8
Образцы, в которых антитела выявлены только гелевым методом	188	49,0
Образцы, в которых антитела выявлены только методом лейкоагглютинации	15	4,0
Образцы, в которых антитела не выявлены	128	33,3
Всего исследовали	384	100

Таблица 3. Результаты выявления тромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями

Обследовано больных	Выявлены антитела	Специфичность антител		
		определена	вероятная	не установлена
285	99 (34,7 %)	3	4	92

тител установить не удалось, так как для выявления антител использовались тромбоциты доноров, типированные только по 10 антигенам, и в панели доноров присутствовали гетерозиготные фенотипы антигенов и отсутствовали гомозиготные.

Обсуждение

Гемоконпонентная терапия, являясь необходимым и высокоэффективным методом лечения, влечет за собой возможность развития сенсibilизации и иммунологических осложнений у больных.

Выявление у реципиентов антител к антигенам эритроцитов является обязательным, и результат присутствия антител учитывается при подборе совместимых эритроцитов доноров для профилактики посттрансфузионных осложнений гемолитического типа. Однако исследование антител к лейкоцитам и тромбоцитам не осуществляется, вследствие чего у реципиентов, имеющих антитромбоцитарные и антигранулоцитарные антитела, при трансфузиях могут развиваться реакции негемолитического типа, обусловленные взаимодействием антител с антигенами перелитых тромбоцитов и гранулоцитов донора.

Проведенные исследования аллоантител к антигенам эритроцитов свидетельствуют о более низкой частоте их встречаемости у обследованных нами гематологических больных по сравнению с данными литературы. Это может быть обусловлено существующей в учреждении системой профилактики аллосенсibilизации, включающей трансфузии эритроцитов с учетом фенотипа донора и реципиента по наиболее иммуногенным антигенам. Такая точка зрения подтверждается данными зарубежных исследователей, которые получили высокий процент сенсibilизации реципиентов при отсутствии подбора пар донор-реципиент по антигенам эритроцитов [4, 14].

Кроме того, низкий процент сенсibilизации у больных гематологическими заболеваниями может быть объяснен также проведением иммуносупрессивной терапии у данной категории лиц.

Большинство выявленных антител было направлено к антигенам эритроцитов системы Rh, что объясняется их высокой иммуногенностью. Из представленных данных можно сделать заключение, что наиболее часто аллосенсibilизация наблюдается к антигенам D, C, c, E и K. В нашем исследовании антитела также чаще выявлялись у лиц, имеющих в анамнезе многократные трансфузии на протяжении

длительного периода времени, а также у женщин с беременностями в анамнезе [15].

Кроме того, нами установлена высокая встречаемость IgM-антител у больных гематологическими заболеваниями, что также соответствует данным литературы, свидетельствующим о частом выявлении неспецифических IgM-антител наряду с аутоантителами при множественных трансфузиях [4].

Известно, что выявление аллоантител к антигенам гранулоцитов является важным элементом диагностики иммунологических конфликтов у лиц с признаками острого повреждения легких, связанного с трансфузией. По аналогии с антителами к антигенам эритроцитов, антигранулоцитарные антитела представляют собой гетерогенную группу — смесь разных классов иммуноглобулинов, поэтому для их выявления используют различные методы исследования и типы реактивов [9].

Для выявления аллоантител к гранулоцитам мы использовали 2 метода исследования, выявляющие антитела разных классов иммуноглобулинов (IgM и IgG), и получили высокий процент сенсibilизации — 66,7 %. Возможно, такой уровень сенсibilизации к антигенам гранулоцитов обусловлен выявлением антител, не имеющих клинического значения. К сожалению, в литературе отсутствуют сведения о роли IgM- и IgG-антител в разрушении гранулоцитов, в связи с чем, на наш взгляд, существует необходимость дальнейшего усовершенствования методов диагностики, позволяющих оценить клиническое значение обнаруженных антигранулоцитарных антител.

Результаты исследования аллоантител к тромбоцитам показали, что 34,7 % обследованных нами больных имели антитела. Это согласуется с данными литературы по аллосенсibilизации к антигенам тромбоцитов у больных, получающих многократные трансфузии. Высокий уровень сенсibilизации объясняется тем, что в настоящее время трансфузии тромбоцитов проводятся без учета специфичности антигенов тромбоцитов донора и реципиента, кроме того, регулярные трансфузии эритроцитарной массы с остатками тромбоцитов и их фрагментов могут вызвать аллоиммунизацию к тромбоцитспецифичным антигенам.

Известно, что у лиц, получавших многократные гемотрансфузии, чаще выявляются полиспецифические антитела, что затрудняет их идентификацию [9]. В нашем исследовании антитела к тромбоцитам не бы-

ли идентифицированы в 97 %. Данные литературы подтверждают, что применение различных методов исследований не приводит к совпадениям результатов, и процесс выявления тромбоцитарных антител затруднен [16]. Очевидно, что внедрение генотипирования тромбоцитов позволит точнее идентифицировать обнаруженные антитела.

Заключение

Эффективность гемокомпонентной терапии в лечении различных заболеваний не подлежит сомнению. Однако многократные трансфузии цельной крови и ее компонентов могут быть причиной иммунологических осложнений, развивающихся по причине выработки у реципиента аллоантител к форменным элементам крови донора. Если выявление антиэритроцитарных антител в настоящее время регламентировано нормативными документами и результат учитывается при подборе пар донор-реципиент, то исследование антител к лейкоцитам и тромбоцитам проводится

в единичных случаях. Однако несовместимость по антигенам приводит к развитию у пациентов реакций негемолитического типа, вызванных взаимодействием антител с антигенами перелитых тромбоцитов и гранулоцитов донора, иммунных нейтропений и тромбоцитопений, конфликта мать-плод. Применение существующих методов исследований антигранулоцитарных и антитромбоцитарных антител не приводит к совпадениям результатов, полученных в разных лабораториях, поэтому усовершенствование существующих и поиск более эффективных методов диагностики антител к антигенам тромбоцитов и гранулоцитов остается актуальной задачей, решение которой позволит: 1) существенно снизить количество посттрансфузионных осложнений; 2) улучшить диагностику заболеваний, сопровождающихся лейкопенией и тромбоцитопенией; 3) решить проблему рефрактерности пациентов к трансфузиям донорских тромбоцитов; 4) выбрать правильную тактику в лечении нейтропений и тромбоцитопений новорожденных.

ЛИТЕРАТУРА

- Daniels G., Pool J., de Silva M. et al. The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med* 2002;12(5):287–95.
- Norton A., Allen D., Murphy M. et al. Platelet alloantigen and antibodies and their clinical significance. *Immunohematol* 2004; 20(2):89–102.
- Schonewille H., Haak H.L., van Zijl A.M. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999;39(7):763–71.
- Sanz C., Nomdedeu M., Belkaid M. et al. Red blood cell alloimmunization in transfused patients with myelodysplastic syndrome or chronic myelomonocytic leukemia. *Transfusion* 2013;53(4):710–5.
- Lin S., Lo S., Lib D. Anti-platelet antibodies in multiply transfused patients. *Vox Sang* 2002;83(2):242.
- Tasaki T., Fujiik K., Gotoh K. et al. Significance of platelet-reactive antibody screening for patients facing frequent platelet transfusions. *Immunohematol* 2002;18(4):104–8.
- Головкина Л.Л., Зотиков Е.А. Аллоиммунизация к антигенам систем HPA и HLA у гематологических больных с множественными трансфузиями компонентов крови. *Новое в трансфузиологии* 2003;34:12–22.
- Lo S., Chang J., Lin S., Lin D.T. Platelet alloimmunization after long-term red cell transfusion in transfusion-dependent thalassemia patients. *Transfusion* 2005;45(5):761–5.
- Kwon S.W., Procter J., Dale J.K. et al. Neutrophil and platelet antibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Vox Sang* 2003;85(4):307–12.
- Минеева Н.В., Елхина Е.В., Бодрова Н.Н. и др. Выявление ауто- и аллоантител к антигенам гранулоцитов методом агглютинации в геле. *Мед иммунол* 2011; 13(2,3):253–6.
- Shibata Y., Juji T., Nishizawa Y. et al. Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang* 1981;41(1):25–31.
- Минеева Н.В., Блинов М.Н., Заварзина О.А. и др. Метод выявления антител к антигенам тромбоцитов. *Трансфузиология* 2007;1–2:47–8.
- Kurata Y., Oshida M., Take H. et al. Acid treatment as a simple procedure for distinguishing platelet-specific antibodies from anti-HLA antibodies: comparison with chloroquine treatment. *Vox Sang* 1990;59(2):106–11.
- Miller S.T., Kim H.Y., Weiner D.L. et al. Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: prevalence in 2010. *Transfusion* 2013;53(4):704–9.
- Пашкова И.А., Рыжанова Л.Г., Федоренко Т.В. и др. Анализ специфичности аллоиммунных антител, выявленных у реципиентов. *Гематол и трансфузиол* 2009;56(2):28–32.
- Moncharmont P., Canillas S., Vignal M. et al. Platelet specific antibodies testing: study of two methods. *Vox Sang* 2007; 93(1):198.