

Антигены и антитела к тромбоцитам (обзор литературы)

Н.В. Минеева, И.И. Кробинец, М.Н. Блинов, С.И. Капустин

ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург

Контакты: Ирина Ивановна Кробинец irina_laborant@mail.ru

В статье представлен обзор литературы о строении антигенов тромбоцитов, показана роль тромбоцитарных антител в патогенезе различных клинических состояний, дана характеристика современных методов выявления антител.

Ключевые слова: тромбоциты, антигены, аллоантитела, аутоантитела, тромбоцитопения новорожденного, аллоиммунизация, HLA, трансфузии тромбоцитов, рефрактерность

Platelet antigens and antibodies. Literature review

N.V. Mineeva, I.I. Krobinets, M.N. Blinov, S.I. Kapustin

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

Platelet antigens structure, role of platelet antibodies in the pathogenesis of various clinical conditions, characteristic of modern antibodies detection methods are presented in this article.

Key words: platelets, antigens, alloantibodies, autoantibodies, neonatal thrombocytopenia, alloimmunization, HLA, platelet transfusion, refractory

Трансфузии тромбоцитов являются эффективным методом лечения многих заболеваний. Однако в некоторых случаях они не только не приводят к ожидаемому клиническому эффекту, но и сопровождаются осложнениями негемолитического типа. Все это послужило стимулом к изучению антигенов тромбоцитов и причин возможной аллоиммунизации.

Тромбоциты являются носителями антигенов различных аллогенных систем. Наиболее значимыми являются антигены собственно тромбоцитарные, главного комплекса гистосовместимости, а также эритроцитов. На мембране тромбоцитов присутствуют антигены системы АВ0, Левис, I, i, P, но отсутствуют антигены систем Резус, Даффи, Келл, Кидд и Лютеран [1–6].

Антигены главного комплекса гистосовместимости — HLA (Human Leukocyte Antigens) — экспрессированы уже на мегакариоцитах и крепко связаны с мембраной тромбоцитов [7]. Существует другая точка зрения, согласно которой присутствие антигенов HLA является результатом их сорбции из плазмы. При этом количество HLA-антигенов, присутствующих в плазме, не коррелирует с количеством таковых на тромбоцитах, так как адсорбируется лишь их малая часть [8]. Тромбоциты несут на своей поверхности только антигены HLA класса I. Среди них преобладают HLA A и HLA B. HLA C на тромбоцитах присутствуют в небольшом количестве. Вариации HLA-экспрессии могут иметь клиническое значение при трансфузиях донорских тромбоцитов с низким содержанием антигенных детерминант способных нормально выживать у больного с HLA-антителами [2, 9]. Количество антигенных детерминант зависит от генотипа: в гомози-

готном состоянии на одном тромбоците содержится от 34 000 до 43 000 молекул HPA-la, в гетерозиготном — от 19 000 до 24 000 молекул. Если сравнить количество HLA-детерминант (например, HLA-A2 присутствует в количестве от 4000 до 10 000 детерминант на тромбоцит), расположенных на том же гликопротеине, можно заметить, что их экспрессировано значительно меньше, чем HPA-детерминант. Эти данные позволяют предположить, что в некоторых случаях антитела к тромбоцитам могут играть более существенную роль в разрушении тромбоцитов, чем анти-HLA-антитела [2, 8].

Номенклатура и молекулярная генетика аллоантигенов тромбоцитов

Тромбоцитам свойственно наличие своих собственных антигенов. Более 20 антигенов были описаны как тромбоцит-специфичные. До 1990 г. не существовало единых подходов к обозначению различных вариантов антигенов тромбоцитов и многие исследователи использовали для обозначения одних и тех же антигенов различные названия, что приводило к путанице и затрудняло сопоставление результатов типирования в различных лабораториях. Современные иммуногенетические методы позволили изучить молекулярную структуру как самой белковой молекулы, так и гена, кодирующего ее синтез. Гены системы HPA локализованы на длинном плече 5, 17 и 22-й хромосом. Наличие аллельных вариантов обусловлено единичным нуклеотидным полиморфизмом (заменой одного нуклеотида в аллель-специфичных участках). В 1990 г. была создана международная номенклатура тромбоцит-специфич-

Таблица 1. Международная номенклатура НРА

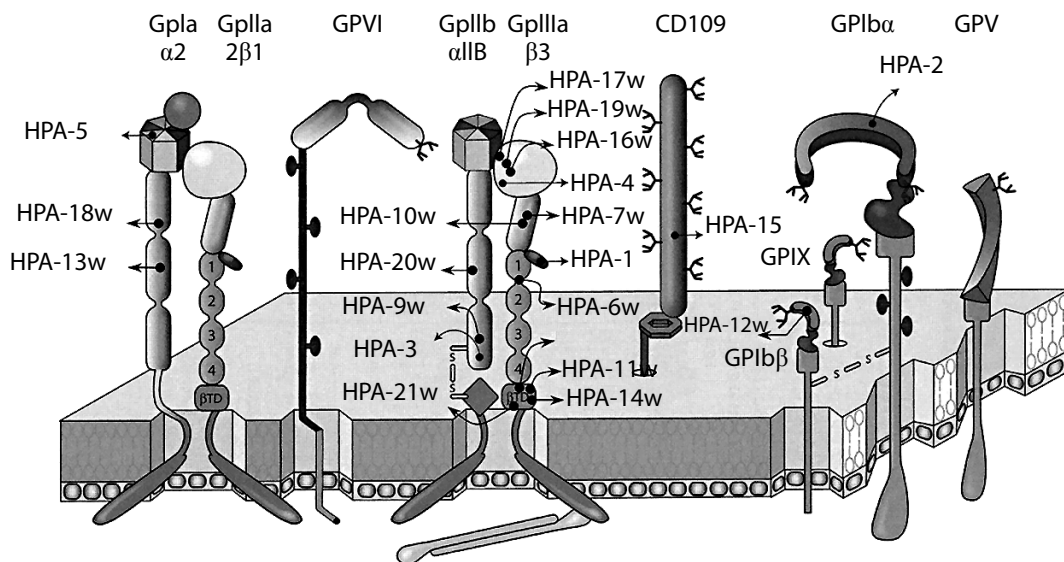
Антиген	Другие названия	Частота фенотипа*, %	Локализация на гликопротеине (GP) мембраны	Нуклеотидная замена в гене	Аминокислотная замена в белке
HPA-1a HPA-1b	Zwa,PIA1 Zwb,PIA2	97,9 28,8	GPIIIa	T ¹⁹⁶ C ¹⁹⁶	Лейцин ³³ Пролин ³³
HPA-2a HPA-2b	Ko ^b Ko ^a ,Sib ^a	> 99,9 13,2	GPIIb α	C ⁵²⁴ T ⁵²⁴	Треонин ¹⁴⁵ Метионин ¹⁴⁵
HPA-3a HPA-3b	Bak ^a ,Lek ^a Bak ^b	80,95 69,8	GPIIb	T ²⁶²² G ²⁶²²	Изолейцин ⁸⁴³ Серин ⁸⁴³
HPA-4a HPA-4b	Yuk ^b ,Pen ^a Yuk ^a ,Pen ^b	> 99,9 < 0,1	GPIIIa	G ⁵²⁶ A ⁵²⁶	Аргинин ¹⁴³ Глутамин ¹⁴³
HPA-5a HPA-5b	Br ^b ,Zav ^b Br ^a ,Zav ^a	99,0 19,7	GPIa	G ¹⁶⁴⁸ A ¹⁶⁴⁸	Глутаминовая кислота ⁵⁰⁵ Лизин ⁵⁰⁵
HPA-6bw	Ca ^a ,Tu ^a	0,7	GPIIIa	G ¹⁵⁶⁴ A ¹⁵⁶⁴	Аргинин ⁴⁸⁹ Глутамин ⁴⁸⁹
HPA-7bw	Mo ^a	0,2	GPIIIa	C ¹²⁶⁷ G ¹²⁶⁷	Пролин ⁴⁰⁷ Аланин ⁴⁰⁷
HPA-8bw	Sr ^a	< 0,01	GPIIIa	T ²⁰⁰⁴ C ²⁰⁰⁴	Аргинин ⁶³⁶ Цистеин ⁶³⁶
HPA-9bw	Max ^a	0,6	GPIIb	G ²⁶⁰³ A ²⁶⁰³	Валин ⁸³⁷ Метионин ⁸³⁷
HPA-10bw	La ^a	< 1,6	GPIIIa	G ²⁸¹ A ²⁸¹	Аргинин ⁶² Глутамин ⁶²
HPA-11bw	Gro ^a	< 0,25	GPIIIa	G ¹⁹⁹⁶ A ¹⁹⁹⁶	Аргинин ⁶³³ Гистидин ⁶³³
HPA-12bw	Iy ^a	0,4	GPIIb β	G ¹⁴¹ A ¹⁴¹	Глицин ¹⁵ Глутаминовая кислота ¹⁵
HPA-13bw	Sit ^a	0,25	GPIa	C ²⁵³¹ T ²⁵³¹	Треонин ⁷⁹⁹ Метионин ⁷⁹⁹
HPA-14bw	Oe ^a	< 0,17	GPIIIa	Δ AAG ^{1929–1931}	Δ Лизин ⁶¹¹
HPA-15a HPA-15b	Gov ^b Gov ^a	74 81	CD109	C ²¹⁰⁸ A ²¹⁰⁸	Серин ⁷⁰³ Тирозин ⁷⁰³
HPA-16bw	Duv ^a	< 1	GPIIIa	C ⁵¹⁷ T ⁵¹⁷	Треонин ¹⁴⁰ Изолейцин ¹⁴⁰
HPA-17bw	Va ^a	< 0,4	GPIIIa	C ⁶²² T ⁶²²	Треонин ¹⁹⁵ Метионин ¹⁹⁵
HPA-18bw	Cab ^a	< 1	GPIa	G ²²³⁵ T ²²³⁵	Глутамин ⁷¹⁶ Гистидин ⁷¹⁶
HPA-19bw	Sta	< 1	GPIIIa	A ⁴⁸⁷ C ⁴⁸⁷	Лизин ¹³⁷ Глутамин ¹³⁷
HPA-20bw	Kno	< 1	GPIIb	C ¹⁹⁴⁹ T ¹⁹⁴⁹	Треонин ⁶¹⁹ Метионин ⁶¹⁹
HPA-21bw	Nos	< 1	GPIIa	G ¹⁹⁶⁰ A ¹⁹⁶⁰	Глутаминовая кислота ⁶²⁸ Лизин ⁶²⁸

* Частота встречаемости среди белых европейцев.

ных аллоантигенов — НРА (Human Platelet Antigens). Согласно этой номенклатуре каждый локус нумеруется последовательно с буквенным обозначением аллеля, один из которых («a») встречается значительно чаще второго («b»). В номенклатуру были включены только те антигены, к которым были выявлены антитела. Если антитела были выявлены только к одному аллелю, то к названию антигена добавляется «w» (HPA-10bw). К настоящему времени хорошо изучены гены 6 основ-

ных локусов (HPA1–5, 15) и несколько редко встречающихся генов, кодирующих продукцию антигенов (табл. 1) [2–5].

Антигены системы НРА локализованы на гликопротеиновых (GP) комплексах как представлено на рисунке [3, 4]. GP-мембраны относятся к семейству интегринов — рецепторов, имеющих сходную структуру и ответственных за взаимодействие между клетками, а также между клетками и белками [1–6].



Локализация антигенов системы HPA на GP мембраны тромбоцита [3, 4]

GP-комплексы являются ключевыми для гемостаза и отвечают за пошаговый процесс прикрепления тромбоцита к поврежденной сосудистой стенке. Комплекс GPIb/IX/V – главный рецептор для фактора Виллебранда, обеспечивающий прикрепление тромбоцитов к поврежденному субэндотелию. Комплекс GPIa/IIa, являясь коллагеновым рецептором, поддерживает связь тромбоцита с коллагеном, тогда как рецептор GPVI проводит сигнал через мембрану внутрь клетки для последующей активации тромбоцита, в результате этого тромбоциты связываются между собой с помощью фибриногена посредством активированных рецепторов GP IIb/IIIa. Функция CD109 изучена недостаточно [10].

Применение молекулярно-генетических методов позволило изучить частоту аллелей среди различных расовых и этнических групп населения. В популяции белых европейцев частота аллелей большинства HPA-систем отклоняется в сторону «а» аллеля, а гомозиготы по «b» составляют около 0–15 %. Исследования частоты встречаемости аллоантигенов тромбоцитов в разных зарубежных популяциях указывают на значительные различия в распространенности этих антигенов среди жителей разных стран. Например, HPA-1 полиморфизм почти отсутствует в популяциях Дальнего Востока, в то время как HPA-4 полиморфизм практически отсутствует у белых европейцев, но присутствует в дальневосточной популяции. Данные о частоте встречаемости HPA в российской популяции ограничены единичными исследованиями. Нами было генотипировано 402 донора г. Санкт-Петербурга. Полученные данные представлены в табл. 2 в сравнении с данными европейской популяции [11].

По нашим данным, у доноров крови г. Санкт-Петербурга гены локусов HPA-1, 2, 3, 5 являются полиморфными, а гены локуса HPA-4 не полиморфны.

Таблица 2. Распределение HPA-генотипов среди белых европейцев и доноров г. Санкт-Петербурга

Генотип	Частота генотипов, %		
	J.G. McFarland, 1993	Bontadini et al., 2000	Собственные данные
HPA-1a/1a	72	78	74,7
HPA-1a/1b	26	16	21,9
HPA-1b/1b	2	6	3,4
HPA-2a/2a	85	76	83,3
HPA-2a/2b	14	22	15,5
HPA-2b/2b	1	2	1,7
HPA-3a/3a	37	53	38,35
HPA-3a/3b	48	38	50,7
HPA-3b/3b	15	9	14,95
HPA-4a/4a	99	нет данных	100
HPA-4a/4b	< 0,1	нет данных	0
HPA-4b/4b	< 0,1	нет данных	0
HPA-5a/5a	80	58,5	83,8
HPA-5a/5b	19	40	16,2
HPA-5b/5b	1	1,5	0

Поэтому, при подозрении на HPA-аллоиммунизацию важно учитывать этническую принадлежность пациентов.

Антитела и их клиническое значение

Гемотрансфузии, беременности и прием лекарственных препаратов стимулируют иммунный ответ

и могут привести к выработке антител к тромбоцитам. Независимо от специфичности индуцированные антитела могут разрушать тромбоциты, что обуславливает снижение их числа в крови. Антитела, вырабатываемые к тромбоцитам, разделяют на аутоантитела, аллоантитела и лекарственно-зависимые антитела [2–5].

В основе патогенеза всех аутоиммунных заболеваний лежит срыв толерантности к собственным антигенам (ауто толерантность). В результате этого возникает иммунный ответ против собственных антигенов или тканей, так как иммунная система продуцирует огромное разнообразие антиген-специфических рецепторов, в том числе способных реагировать с ауто-антигенами. Тромбоцитарные аутоантитела направлены против GP-тромбоцитов [12]. По данным литературы, большинство антител связываются с рецепторными GP-комплексами IIb/IIIa и Ib/IX. Большая часть аутоантител принадлежит к классу IgG, меньшая часть — к IgM и IgA. Выработка аутоантител к тромбоцитам может приводить к развитию аутоиммунной тромбоцитопенической пурпуры, тромбоцитопении новорожденных (опосредованной наличием аутоиммунных антител у матери) и рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов (при наличии аутоантител у реципиента) [13].

Сенсибилизация аллоантигенами в результате беременностей или гемотрансфузий может приводить к выработке аллоантител. По специфичности аллоантитела к тромбоцитам подразделяют на 3 группы: АВ0-антитела, HLA-антитела и антитела к тромбоцит-специфичным антигенам [1–5].

Появление у реципиента анти-НРА и анти-HLA-антител может являться причиной развития иммунологических реакций негемолитического типа и привести к полному отсутствию клинического эффекта от переливания тромбоцитов. Иногда после трансфузий тромбоцитов доноров, несовместимых с реципиентом как по НРА, так и HLA, в организме больного происходят тяжелые нарушения в иммунной системе, проявляющиеся развитием аутоиммунной тромбоцитопении и приводящие к тяжелым геморрагическим проявлениям [13].

Установлено, что HLA-иммунизация развивается только в ответ на введение несовместимых лейкоцитов. Трансфузии тромбоцитов сами по себе не могут вызвать выработку HLA-антител, так как они не содержат антигенов II класса гистосовместимости, необходимых для Т-хелперной активации В-клеток (только В-лимфоциты, активированные Т-клетками и моноцитами крови, могут давать необходимый стимул для продукции антител) [12]. Аллоиммунизация к антигенам тромбоцитов возникает чаще у реципиентов, имеющих в анамнезе многократные трансфузии цельной крови и компонентов, так как с каждой последующей трансфузией повышается вероятность получения антигена, отсутствующего у реципиента, и возникновения иммунного ответа.

Клиническими последствиями аллоиммунизации могут быть: рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов, посттрансфузионная тромбоцитопеническая пурпура (ПТП) и аллоиммунная тромбоцитопения плода и новорожденного (АИТПН) [1–5].

Рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов

Осложнением трансфузий тромбоцитов является состояние рефрактерности, определяемое как отсутствие существенного увеличения их количества у реципиента в ответ на переливание тромбоцитного концентрата. Развитие рефрактерности может быть обусловлено иммунными или неиммунными причинами. Однако, у пациентов, получающих множественные трансфузии, этиология рефрактерности может быть многофакторной. Неиммунными причинами развития рефрактерности являются спленомегалия, ДВС-синдром, прием лекарственных препаратов (например, амфотерицин В), тромбоз вен печени. Иммунная тромбоцитарная рефрактерность связана с наличием антител у реципиента [1–5, 14]. Главной причиной иммунной рефрактерности у пациентов с множественными трансфузиями является наличие HLA-A и/или HLA-B-антител. У 3–9 % рефрактерных пациентов встречаются НРА-антитела (анти-НРА-1a, 1b, 3a, 2b и 15b-антитела) в сочетании с HLA-антителами [5]. HLA-антитела преимущественно встречаются у женщин, имеющих в анамнезе беременности, и у пациентов с множественными трансфузиями. Развитие HLA-сенсибилизации при трансфузиях обусловлено примесью лимфоцитов, содержащихся в большинстве гемокомпонентов [14]. Пороговой величиной, так называемой «дозой иммуногенной нагрузки», является 1×10^6 клеток на трансфузию [15]. Однако описаны случаи отсутствия рефрактерности у некоторых пациентов с HLA-антителами после трансфузии случайно отобранных донорских тромбоцитов. Этот феномен может наблюдаться при трансфузии тромбоцитов со слабой экспрессией антигенов HLA локуса В. Например, может быть «широкая» специфичность экспрессии В12 и его «сплитов» — В44 и В45 на тромбоцитах и лимфоцитах [9, 14].

Высокий титр АВ0-антител, тромбоцитарные аутоантитела и лекарственно-зависимые антитела у реципиента также могут стать причиной рефрактерности. Сроки развития рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов у реципиентов зависят от количества трансфузий в анамнезе. У пациентов с множественными трансфузиями в анамнезе рефрактерность развивается в течение 10 дней, а у пациентов, в анамнезе которых трансфузий не было, рефрактерность возникает в среднем через 60 дней. Причем у больных, не имеющих в анамнезе трансфузий, развитие рефрактерности наступало после переливания тромбоцитов и эритроцитов по объему в 2 раза превосходящему объемы, необходимые для получения рефрактерности

у больных, в анамнезе которых гемотрансфузии были [14, 16–19].

Посттрансфузионная тромбоцитопеническая пурпура

Клинический случай тромбоцитопении, развившейся у женщины на 7-е сутки после трансфузии тромбоцитов и спонтанно разрешившейся через 3 нед, был впервые описан в 1959 г. van Loglem et al. Спустя 2 года подобный случай описали Shulman et al. и ввели термин «посттрансфузионная тромбоцитопеническая пурпура». ПТП развивается у сенсibilизированного реципиента с анти-НРА-антителами, которому переливают тромбоциты донора с антигенами, к которым имеются антитела. Данное осложнение развивается у гомозиготных по НРА реципиентов и может ассоциироваться с тромбоцитарными антителами одной или нескольких специфичностей [14]. ПТП чаще встречается у женщин, имеющих в анамнезе беременности, развивается на 7–10-е сутки после трансфузии тромбоцитов и сопровождается тромбоцитопенией. Заболевание начинается быстро и характеризуется падением количества тромбоцитов менее 10×10^9 . Средняя и тяжелая степень течения сопровождается кровотечением из слизистых оболочек пищеварительного и мочевого тракта. Развитие данного осложнения связано с наличием определенной аллели HLA II класса-DRB3*01:01 [4]. Специфичность антител, вызывающих данное осложнение, установлена только в нескольких исследованиях зарубежных авторов. Чаще всего причиной ПТП являются антитела анти-НРА-1а (85 % случаев), 2b (5 %), 3а (7 %) [5].

Аллоиммунная тромбоцитопения плода и новорожденного

АИТПН развивается в результате разрушения тромбоцитов ребенка антителами матери, направленными против специфических НРА. Частота встречаемости данной патологии составляет 1 случай на 1200 родов в европейской популяции и 1 на 500–700 родов в Японии [4, 5]. Патогенез данного заболевания аналогичен патогенезу гемолитической болезни новорожденных, обусловленной несовместимостью матери и плода по антигену D системы Резус. В отличие от несовместимости по D-антигену, АИТПН может развиться уже при первой беременности [20–24]. Выработка антител у матери при беременности происходит к антигенам тромбоцитов плода, унаследованным от отца и отсутствующим у матери. Антитела матери, принадлежащие к IgG, проникая через плацентарный барьер и адсорбируясь на антигенах тромбоцитов плода, вызывают их деструкцию макрофагами [20]. Большинство антигенов тромбоцитов плода экспрессируются уже к 18-й неделе беременности, поэтому деструкция тромбоцитов может наблюдаться на ранних сроках. После рождения тяжесть проявления тромбоцитопении зависит от скорости удаления анти-тромбоцитарных антител матери из кровотока плода.

Обычно количество тромбоцитов плода возвращается к норме в течение 1–3 нед после родов. Заболевание часто является кратковременным, протекающим без последствий для здоровья ребенка. Но встречаются и тяжелые формы с развитием внутричерепных кровоизлияний и, как следствие, неврологических нарушений или смерти в период тромбоцитопении. Согласно данным литературы, половина случаев внутричерепных кровоизлияний, ассоциированных с аллоиммунной тромбоцитопенией, происходит внутриутробно [20–24]. В европейской популяции 2–2,5 % беременных женщин не имеют антигена НРА-1а, и большинство из них ожидают детей НРА-1а положительных, так как 97,5 % людей имеют этот антиген. Однако только 6–12 % этих женщин вырабатывают НРА-1а-антитела. Выработка антител связана со специфичностью антигена HLA-DR. Так, наличие у матери аллели HLA-DRB3*01:01 стимулирует выработку анти-НРА-1а-антител, а наличие HLA-DRB1*13 и HLA-DRB1*14 — анти-НРА-5b-антител [22, 25]. Среди белого населения 80–90 % случаев АИТПН обусловлены анти-НРА-1а-антителами, 10–15 % — анти-НРА-5b-антителами и малая часть — анти-НРА-3а-антителами. В литературе также описаны случаи тромбоцитопении, вызванной антителами другой специфичности [5, 26–30].

Подбор тромбоцитов для трансфузии

В клинической медицине широко применяются гемотрансфузии крови и ее компонентов, в частности тромбоцитарных концентратов. В соответствии с требованиями по переливанию крови в нашей стране и за рубежом тромбоциты пары донор — реципиент должны быть идентичны по антигенам систем АВ0 и Rh. Однако, при ограниченном количестве доноров и большом числе нуждающихся реципиентов, допускаются трансфузии тромбоцитов группы крови 0 реципиентам других групп. В этом случае существует опасность осложнения гемолитического типа из-за высокого титра АВ0-антител у донора. В литературе описаны подобные случаи и установлено, что риск развития посттрансфузионных осложнений гемолитического типа выше у реципиентов с множественными трансфузиями тромбоцитов и особенно у детей. Оптимальным способом лечения тромбоцитопений новорожденных являются трансфузии тромбоцитов идентичных по АВ0 и Rh, с низким титром естественных антител и совместимых по НРА- и HLA-антигенам [31, 32].

В связи с объективной трудностью исследования антигенов тромбоцитов и лейкоцитов, подбор совместимых по антигенам тромбоцитов и лейкоцитов пар донор — реципиент не проводится. Обычно однократная трансфузия тромбоконцентрата, полученного аферезом, не требует подбора по системе HLA и НРА. Аллоиммунизированные пациенты с множественными трансфузиями и рефрактерностью к тромбоцитам

в анамнезе требуют комплексного подхода к подбору гемокомпонента, предусматривающего совместимость по антигенам HLA I класса локусов A и B или постановку перекрестной лимфоцитотоксической пробы на совместимость. Число подходящих доноров обеспечивается при наличии регистра типированных доноров в 2–5 тыс. человек. Однако было замечено, что около 30 % трансфузий тромбоцитов, подобранных в лимфоцитотоксическом тесте, являются неэффективными. Трансфузии тромбоцитов, совместимых по антигенам системы HLA, у 20–25 % больных приводили к выработке антител против специфических антигенов тромбоцитов [33–35].

Все перечисленное привело к применению за рубежом, кроме HLA-перекрестной пробы, перекрестной пробы с тромбоцитами донора, а также к типированию антигенов тромбоцитов при подборе совместимых гемокомпонентов аллоиммунизированным реципиентам [9].

Учитывая определенные трудности типирования тромбоцитарных антигенов серологическими методами, в последние годы все чаще с этой целью применяются молекулярно-генетические методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). С учетом имеющихся в настоящее время данных о характере и месторасположении единичных нуклеотидных замен, обуславливающих полиморфизм HPA, молекулярно-генетические методы типирования антигенов тромбоцитов сводятся к детекции этих замен в структуре ДНК соответствующих генов [36].

Молекулярно-генетические методы детекции антигенов тромбоцитов

Для детекции HPA к настоящему времени предложено несколько методов, основанных на технологии ПЦР: полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), ПЦР с аллель-специфическими праймерами (ПЦР-АСП) и ПЦР-гибридизация с аллель-специфическими олигонуклеотидами (АСО) [37–39].

Коротко остановимся на каждом из них.

ПЦР-ПДРФ-метод основан на том, что в результате мутации (нуклеотидной замены) в ДНК появляются новые (или утрачиваются существовавшие) места (сайты) узнавания для специфических рестриктаз — ферментов, способных разрезать ДНК в строго определяемых последовательностями нуклеотидов участках. Таким образом, обработка амплифицированного в ПЦР исследуемого участка ДНК соответствующим образом подобранной рестриктазой и последующее разделение продуктов рестрикции (чаще всего электрофорезом в агарозе или полиакриламидном геле) позволяет по картине ПДРФ выявить искомую мутацию. Данный методический подход достаточно широко используется для детекции единичных нуклеотидных замен, в том числе и для типирования HPA.

ПЦР-АСП метод основан на использовании в ПЦР так называемых аллель (или сиквенс)-специ-

фических праймеров (АСП), комплементарных или нормальному, или мутированному аллелю. Кроме того, в реакции используется и так называемый «общий» праймер, комплементарный участку ДНК как нормального, так и мутированного аллеля.

ПЦР при типировании HPA проводится в 2 пробах для каждого антигена, которые отличаются друг от друга используемыми АСП. Продукт ПЦР — амплификат — выявляется в той пробе, где тестируемая ДНК содержит участок, комплементарный одному из двух АСП. Обнаружение амплификата в обеих пробах свидетельствует о гетерозиготном носительстве исследуемого аллеля. Этот метод был впервые использован при типировании антигенов системы HLA, а затем и для генотипирования тромбоцитов.

В последние годы в научно-исследовательских лабораториях широко внедрено типирование антигенов, основанное на секвенировании — SBT (sequence-based typing). Секвенирование представляет собой определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК путем получения серии комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание. Этот метод позволяет получить информацию о полной последовательности ДНК (новых аллелях и мутациях). Главными недостатками технологии SBT являются:

- трудоемкость (сложная и длительная процедура подготовки ДНК для секвенирования);
- низкая производительность;
- высокая стоимость оборудования и реагентов и, как следствие, высокая себестоимость типирования одного образца;
- отсутствие у компаний-производителей секвенаторов специальных реагентов, оборудования и программного обеспечения для серологического типирования и для определения антител к антигенам HPA и HLA. Поэтому данный метод вряд ли найдет широкое применение в клинических лабораториях в ближайшее время.

Широкое использование тест-систем, основанных на описанных методах ПЦР, для типирования тромбоцитов в повседневной практике лабораторий затруднено необходимостью проведения электрофореза для оценки конечного результата реакции. Поэтому в настоящее время разработаны тест-системы для ПЦР в реальном времени, позволяющие значительно упростить процесс исследования [40–44].

Выявление антител к тромбоцитам

Проведенный нами анализ данных литературы о существующих методах выявления антитромбоцитарных антител, показал, что наиболее эффективными являются методы иммуноферментного анализа и иммунофлюоресцентные [45–47]. Однако проведение тестов с использованием указанных методов требует наличия дорогостоящего оборудования и/или реактивов, что ограничивает их применение. В связи с этим, за рубежом был разработан твердофазный антигло-

булиновый тест, принцип которого заключается в адсорбции донорских тромбоцитов, предварительно сенсibilизированных исследуемой сывороткой реципиента, на поверхность плашки и последующей детекции антител после добавления эритроцитов, нагруженных анти-IgG-антителами. При наличии в исследуемой сыворотке антитромбоцитарных антител, анти-IgG взаимодействует с ними, что приводит к равномерному распределению эритроцитов по плашке. При отсутствии антитромбоцитарных антител эритроциты образуют осадок в виде точки. Многими авторами была показана высокая чувствительность твердофазного метода для определения ауто- и аллоантител [45].

«Золотым стандартом» для идентификации тромбоцит-специфических антител признан метод иммобилизации тромбоцитарных антигенов специфическими моноклональными антителами (МАІРА) с использованием моноклональных мышинных антител, специфичных к гликопротеинам тромбоцитов. Преимущество МАІРА состоит в том, что антитела (человека и мышинные) присоединяются к соответствующему антигену мембраны тромбоцита, что позволяет сократить ложноположительные реакции. Метод позволяет не только выявлять антитела, но и проводить фенотипирование редко встречающихся антигенов (например, НРА-5b/5b). Однако метод имеет и свои недостатки. Выявление антител основано на формировании трехмолекулярного соединения, связывающего мышинные и человеческие антитела с мембраной тромбоцита, на которой локализованы соответствующие эпитопы. Ложноотрицательные результаты могут наблюдаться вследствие конкуренции между человеческими и мышинными антителами за присоединение к одному и тому же эпитопу, что затрудняет диагностику иммунных тромбоцитопений. Кроме того, метод очень трудоемкий и не подходит для скрининга [48, 49].

Другим методом, обладающим высокой чувствительностью и специфичностью, является метод проточной цитофлуориметрии. Метод позволяет выявлять антитромбоцитарные антитела разных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG и IgA) [34]. По данным литературы, проточная цитометрия является первым шагом для выявления антител. Преимуществами служат высокая скорость, позволяющая анализировать большие клеточные объемы, и возможность выполнения сложных одновременных измерений нескольких параметров каждой клетки в одной суспензии. Все это позволяет использовать метод для скрининговых исследований [50–51]. На втором этапе применяется метод МАІРА, позволяющий определять специфичность антител. Такой алгоритм дает возможность проводить исследования антител более эффективно [48, 49].

Определенную трудность в стандартизацию методов выявления алло- и аутоантител к тромбоцитам вносит отсутствие референтных образцов с установленной специфичностью (обычно такие образцы используются для постановки положительного контроля для подтверждения правильности исследования антител по аналогии с использованием моноклональных антител к антигенам эритроцитов при их типировании). В последние годы было получено несколько образцов моноклональных антител, имеющих специфичность к антигенам тромбоцитов, в частности анти-НРА-1a, 3b. Однако эти немногие образцы зачастую получены к синтетическому пептиду, содержащему НРА-1a, и не взаимодействуют с указанным антигеном, присутствующим на интактных тромбоцитах, поэтому могут использоваться только в иммуноферментном методе [52].

С целью стандартизации методов выявления антител к антигенам тромбоцитов периодически проводятся многоцентровые исследования. На 15-м рабочем совещании ISBT (Международного общества переливания крови) анализировали результаты выявления аутоантител в образцах сыворотки, полученных от 2 пациентов с иммунной тромбоцитопенией, а также оценивали чувствительность и специфичность выявления аллоантител анти-НРА-1a и анти-НРА-3 и методы НРА-генотипирования с помощью стандартных протоколов. Результаты тестирования образцов сывороток с антителами, проведенного 30 лабораториями-участниками, были неоднозначны. Выявленные специфичности аутоантител разнились между лабораториями, были найдены отсутствующие специфичности и в одном из образцов не получен общий результат. С выявлением анти-НРА-1a-антител и генотипированием НРА успешно справились все лаборатории; трудно диагностируемые анти-НРА-3a и анти-НРА-3b не были определены во многих лабораториях. На основании проведенного анализа сделан вывод о том, что протоколы и методы исследования антител требуют доработки [49]. Аналогичные данные получили R. Fontão-Wendel et al. при исследовании частоты сенсibilизации к антигенам тромбоцитов у пациентов многопрофильного стационара до и после трансфузий методами флуоресценции, МАІРА, проточной цитофлуориметрии и в лимфоцитотоксическом тесте. Анализ данных показал, что не было 100 % совпадения результатов тестирования разными методами. Только в 8,1 % образцов антитела были выявлены всеми 4 методами [53].

Таким образом, анализ данных литературы свидетельствует о том, что методы выявления антител к антигенам тромбоцитов нуждаются в дальнейшем изучении, совершенствовании и стандартизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Norton A., Allen D., Murphy M. Review: Platelet alloantigen and antibodies and their clinical significance. *Immunohematology* 2004;20(2):89–102.
2. Зотиков Е.А., Бабаева А.Г., Головкина Л.Л. Тромбоциты и антитромбоцитарные антитела. М.: Монолит, 2003. 128 с.
3. Transfusion and transplantation science (Fundamentals of biomedical science). Editor R. Knight. Oxford, 2012. 304 p.
4. Murphy M., Pamphilon D. Practical Transfusion Medicine. Wiley-Blackwell, 2013. 549 p.
5. Green A., Hoffbrand A., Catovsky D. et al. Postgraduate Haematology. Wiley-Blackwell, 2011. 1076 p.
6. Landau M., Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion* 2011;51:558–69.
7. Gouttefangeas C., Diehl M., Keilholz W. Thrombocyte HLA molecules retain nonrenewable endogenous peptides of megakaryocyte lineage and do not stimulate direct alloctyotoxicity *in vitro*. *Blood* 2000;95(10):3168–75.
8. Kao K.J., Scornik J.C., McQueen C.F. Evaluation of individual specificities of class I HLA on platelet by a new developed monoclonal antibody. *Hum Immunology* 1990;27(4):285–97.
9. Schiffer C.A. Management of alloimmunized, refractory patients in need of platelet transfusions. *Vox Sang* 1997;73:197–8.
10. Воронина Е.Н., Филипенко М.Л., Сергеевич Д.С. и др. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм. Вестник ВОГиС 2006;10(3):553–64.
11. Bontadibi A., Tazzari P.L., Manfroi S. et al. Human-platelet-antigen and neutrophil-antigen gene frequency in the Italian population determined by polymerase chain reaction with sequence specific primers. *Haematologica* 2000;85:430.
12. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б. и др. Иммунология. М.: Логосфера, 2007. 555 с.
13. Chong B.H. Diagnosis, treatment and pathophysiology of autoimmune thrombocytopenias. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;20(3):271–96.
14. Kickler T. The challenge of platelet alloimmunization: management and prevention. *Transfus med rev* 1990; 4(4 Suppl. 1):8–18.
15. Мельникова В.Н., Кириянов Г.Ю., Филиппова О.И. Карантинизация лейкофильтрованных донорских эритроцитов — важное звено в обеспечении инфекционной и иммунологической безопасности гемотрансфузий. *Трансфузиол* 2007;8(1–2):63.
16. Tasaku T., Fujii K., Gotoh K. et al. Significance of platelet-reactive antibody screening for patients facing frequent platelet transfusions. *Immunohematology* 2002;18(4):104–8.
17. Allen D., Samon J., Benjamin S. et al. Survey of the use and clinical effectiveness of HPA-1a/5b-negative platelet concentrates in proven or suspected platelet alloimmunization. *Transfusion Med* 2004;14:409–17.
18. Lin S., Lo S., Lib D. Anti-platelet antibodies in multiply transfused patients. *Vox Sang* 2002;83(2):242.
19. Головкина Л.Л., Зотиков Е.А. Алло-иммунизация к антигенам систем HPA и HLA у гематологических больных с множественными трансфузиями компонентов крови. Новое в трансфузиологии 2003;34:12–22.
20. Масчан А.А., Румянцев А.Г. Иммуно-опосредованные тромбоцитопении новорожденных: дифференциальный диагноз и принципы терапии. *Вопр гематол/онкол и иммунопатол в педиатрии* 2010;9(3):3–7.
21. Kaplan C. Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a 50-year story. *Immunohematol* 2007;23(1):9–13.
22. Muniz-Diaz E. Diagnostic evaluation of FNAIT. *ISBT Science Series* 2007;2:48–55.
23. Husebekk A., Kjaer Kilie M., Kjeldsen-Kragh J. et al. Screening of anti-HPA-1a antibodies in HPA-1a-negative mothers. *Science Series* 2007;2:111–3.
24. Husebekk A., Skogen B., Kilie M.K. et al. Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT). *ISBT Science Series* 2011;6:261–4.
25. Loewenthal R., Rosenberg N., Kalt R. et al. Compound heterozygosity of HLA-DRB3*01:01 and HLA-DRB4*01:01 as a potential predictor of fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2013;53:344–52.
26. Davoren A., Curtis B.R., Aster R.H. et al. Human platelet antigen-specific alloantibodies in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2004;44:1220–5.
27. Davonen A., Smith G., Lucas G. et al. Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to HPA-3a antibodies: a case report. *Immunohematology* 2002;18(Suppl. 2): 33–6.
28. Foxcoft Z. Intrauterine death involving fetomaternal alloimmune thrombocytopenia due to HPA 5a antibodies. *Vox Sang* 2004;87(3):133.
29. Peterson J.A., Balthazor S.M., Curtis B.R. et al. Maternal alloimmunization against the rare platelet-specific antigen HPA-9b is an important cause of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 2005;45:1487–95.
30. Marin L., Torio A., Muro M. et al. Alloimmune neonatal neutropenia and thrombocytopenia associated with maternal anti HNA-1a, HPA-3b, HLA antibodies. *Pediatr/Allergy/Immunol* 2005;16:279–82.
31. Shehata N., Tinmouth A., Naglie G. et al. AB0-identical versus nonidentical platelet transfusion: a systematic review. *Transfusion* 2009;49(11):2442–53.
32. Moolten D. Group 0 red blood cells in massive transfusion-when to pull the switch? *Immunohematology* 2008;24(3):116–8.
33. Allen D., Ouwehand M., Kekomaki R. et al. Interlaboratory variation in the detection of HPA-specific alloantibodies and in molecular HPA typing. *Vox Sang* 2007;93:316–24.
34. Bertrand G., Drame G., Martageix C. et al. Prediction of the fetal status in non-invasive management of alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2010;10:1182.
35. Nance S., Hsu S., Vassallo R. et al. Review: Platelet matching for alloimmunized patients — room for improvement. *Immunohematology* 2004;20(2):80–8.
36. Veldhuisen B., van der Schoot C.E., Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sang* 2009;97:198–206.
37. Metcalfe P., Waters A.H. HPA-1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP): a rapid and simple technique. *Br J Haematol* 1993;85:227–31.
38. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 1988;16:1215–8.
39. Gavanagh G., Dunn A.N., Chapman C.T. HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations. *Transfusion Med* 1997;7:41–5.
40. Panzer S. Report on the Tenth International Platelet Genotyping and Serology Workshop on behalf of the International Society of Blood Transfusion. *Vox Sang* 2001;80:72–8.
41. Li R., Pei B., Li Q. Multicolor real-time polymerase chain reaction genotyping of six human platelet antigens using displacing probes. *Transfusion* 2007;47:1637–42.
42. Ёлов А.А., Бурый В.В., Минеева Н.В. и др. Типирование антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени. Молекулярная диагностика. Сб трудов VII всерос науч.-практич. конфер с международным участием 2010;III:60–1.
43. Ёлов А.А., Лихонин А.Г. Генотипирование ДНК доноров и реципиентов крови как метод обеспечения антигенной безопасности трансфузий. *Трансфузиол* 2009;10(1–2):33.
44. Минеева Н.В., Ёлов А.А., Бурый В.В. и др. Типирование антигенов тромбоци-

тов доноров и пациентов методом ПЦР в реальном времени. Трансфузиол 2011;12:62.

45. 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.

46. Nguyen X., Dugrillon A., Beck C. et al. Novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. Br J Haematol 2004;127(5):552–60.

47. Meyer O., Agaylan A., Bombard S. et al. Novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping. Vox Sang 2006;91:324–30.

48. Kaplan C., Freedman J., Foxcroft Z. et al. Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: a statement. Vox Sang 2007;93:298–9.

49. Sachs U.J., Kiefel V., Kroll H. et al. Report on the 15th International Society of Blood Transfusion platelet immunology workshop. Vox Sang 2012;103:343–52.

50. Hezard N., Simon G., Mace C. et al. Is flow cytometry accurate enough to screen platelet autoantibodies? Transfusion 2008;48:513–8.

51. Lucas G., Culliford S., Green A. et al. Recipient-derived HPA-1a antibodies: a cause of prolonged thrombocytopenia after unrelated

donor stem cell transplantation. Transfusion 2010;50:334–9.

52. Ghevaert C., Wilcox D.A., Fang J. et al. Developing recombinant HPA-1a-specific antibodies with abrogated Fcγ receptor binding for the treatment of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. J Clin Invest 2008;118(8):2929–38.

53. Fontão-Wendel R., Silva L., Saviolo C. et al. Incidence of transfusion-induced platelet-reactive antibodies evaluated by specific assay for the detection of human leukocyte antigen and human platelet antigen antibodies. Vox Sang 2007;93(3):241–9.