



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.9.1.009>
УДК 615.38:612.111.7]:575.21/22



Дашкевич Э.В. ✉, Бухвальд Н.А., Пешняк Ж.В., Семенов Г.В., Карпенко Ф.Н.
Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских
биотехнологий, Минск, Беларусь

Рефрактерность к трансфузиям тромбоцитов: диагностика и подбор пар «донор – реципиент»

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Дашкевич Э.В. – замысел и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, выводы и подготовка статьи, окончательный вариант статьи для публикации; Бухвальд Н.А. – проведение лабораторных исследований, сбор данных, интерпретация данных; Пешняк Ж.В. – проведение лабораторных исследований, сбор данных, интерпретация данных; Семенов Г.В. – методическое сопровождение HLA лабораторных тестов, интерпретация данных; Карпенко Ф.Н. – организационное и методическое сопровождение.

Подана: 25.11.2022

Принята: 17.01.2023

Контакты: eleonoravdoc@gmail.com

Резюме

В статье на основании клинического материала изучена частота встречаемости антител к антигенам тромбоцитов HLA и HPA у пациентов с рефрактерностью к трансфузиям тромбоцитов различных нозологических групп. Проведен подбор тромбоцитных компонентов крови в соответствии с выявленной аллосенсибилизацией, оценена клинично-лабораторная эффективность через 24 часа.

Ключевые слова: тромбоцитные компоненты крови, антигены тромбоцитов HLA и HPA, подбор пар «донор – реципиент»

Dashkevich E. ✉, Bukhvald N., Peshnyak J., Semenov G., Karpenko F.
Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies,
Minsk, Belarus

Refractoriness to Platelet Transfusions: Diagnosis and Selection of Donor-Recipient Pairs

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Dashkevich E. – the idea and design of the study, analysis and interpretation of data, conclusions and preparation of the article, the final version of the article for publication; Bukhvald N. – laboratory research, data collection, data interpretation; Peshnyak J. – laboratory research, data collection, data interpretation; Semenov G. – methodological support of HLA laboratory tests, data interpretation; Karpenko F. – organizational – methodological support.

Submitted: 25.11.2022

Accepted: 17.01.2023

Contacts: eleonoravdoc@gmail.com

Abstract

In the article, on the basis of clinical material, the frequency of occurrence of antibodies to platelet antigens HLA and HPA in patients with refractoriness to platelet transfusions

of various nosological groups was studied. The selection of platelet blood components was carried out in accordance with the identified allosensitization, the clinical and laboratory efficacy was evaluated after 24.

Keywords: platelet blood components, platelet antigens HLA and HPA, selection of donor-recipient pairs

■ ВВЕДЕНИЕ

Переливание тромбоцитных компонентов крови (ТКК) в последние годы стало обязательным условием программной терапии заболеваний системы кроветворения, проведения трансплантации костного мозга, подготовки к хирургическим и акушерским вмешательствам. Под «защитой» переливаний ТКК проводятся курсы интенсивной химиотерапии с заранее планируемым периодом длительного агранулоцитоза и тромбоцитопении, выполняются полостные операции (лапаротомия, спленэктомия), невозможные ранее.

В настоящее время при переливании ТКК учитывают идентичность донора и реципиента только по системе ABO и Rh. Установлено, что терапевтической дозой ТКК является переливание не менее $50\text{--}70 \times 10^9/\text{л}$ тромбоцитов на каждые 10 кг массы тела или $200\text{--}250 \times 10^9$ на 1 м^2 поверхности тела [1].

Однако с целью профилактики иммунных реакций (клинико-лабораторной рефрактерности к трансфузиям ТКК) необходимо учитывать фенотипы донора и реципиента по антигенам главного комплекса гистосовместимости (HLA) и по собственно тромбоцитарным антигенам HPA (известно около 30). Тромбоциты человека являются носителями антигенов различных аллогенных систем. Наиболее значимыми являются антигены HLA, HPA, а также антигены эритроцитов (ABO, Lewis, I, i, P). Антигены системы Rh на тромбоцитах играют незначительную роль в аллоиммунизации [2, 3]. Из антигенов HLA I класса на поверхности тромбоцитов преобладают локусы HLA A и HLA B. HLA C на тромбоцитах присутствуют в небольшом количестве и, как правило, не играют большой роли в аллоиммунизации. Иммунная рефрактерность у реципиента к трансфузиям донорских тромбоцитов может наблюдаться при наличии аутоантител, аллоантител и лекарственно-зависимых антител. Согласно данным литературы, склонность к антителообразованию также зависит от HLA- и HPA-генотипа, а также иммуногенности HPA [4]. Высокоиммунные HLA- и HPA-антитела могут вызывать также посттрансфузионную тромбоцитопению. Сниженный прирост тромбоцитов при трансфузии ТКК в результате персистирования анти-HLA- и анти-HPA-антител может потребовать использования HLA- и HPA-совместимых тромбоцитов [5].

У пациентов с длительным трансфузионным анамнезом, данными о рефрактерности к трансфузиям ТКК целесообразно определять наличие антител, при этом стоит учитывать, что неиммунные факторы могут достигать 80% [6–9]. Согласно данным литературы, этот подход учитывается при трансфузии ТКК [10–12]. Предтрансфузионный «cross-match» ТКК проводится с подобранными донорами [11]. Проведенный I. Fagundes et al. (2020) [11] анализ у 75 пациентов с рефрактерностью позволил выявить в 67% (50/75) случаев наличие антител анти-HLA или анти-HPA.

Исходя из вышесказанного, для повышения эффективности трансфузий, минимизации риска развития рефрактерности к тромбоцитам донора и возникновения



посттрансфузионных осложнений необходимо осуществлять подбор пар «донор – реципиент» для проведения трансфузий ТКК.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провести анализ клинических случаев и оценку эффективности подбора ТКК для реципиентов, резистентных к трансфузиям тромбоцитов.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 37 реципиентов с выявленной клинико-лабораторной рефрактерностью к трансфузиям ТКК. Из 37 реципиентов 12 были мужского пола в возрасте от 1,7 месяца до 83 лет и 25 – женского пола в возрасте от 1 года 8 месяцев до 70 лет.

Определение фенотипа HLA I класса и антител к HLA, а также HPA-антител проводилось на базе РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий. Образцы сыворотки и плазмы крови были получены согласно форме 441/у-07 (приложение 41 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.09.2007 № 788 «Направление на индивидуальный подбор»), из них 23 образца поступили из республиканских научно-практических центров и 14 – из учреждений здравоохранения г. Минска с целью подбора пар «донор – реципиент» для последующей трансфузии ТКК. Критерием диагностики рефрактерности было отсутствие эффекта от трансфузий тромбоцитов в рассчитанной дозе через 24 часа после введения.

Для проведения исследований по подбору пар «донор – реципиент» использовались следующие методы: иммуногематологические, микролимфоцитотоксический тест (ЛЦТ), иммуноферментный анализ, клинико-статистический.

1. Определение фенотипа антигенов HLA I класса. Проводилось серологическим методом с использованием микролимфоцитотоксического теста. Исследования проводили с лимфоцитами, полученными из цельной венозной крови, путем забора в пробирки Vacutainer с натрий-гепарином. Выделение лимфоцитов периферической крови осуществляли методом сепарации лимфоцитов по Boyum A. с помощью центрифугирования в градиенте плотности, основанном на различиях в удельной плотности форменных элементов крови. Метод гарантирует получение взвеси лимфоцитов с минимальной примесью других форменных элементов крови и жизнеспособностью клеток 95–98%. Данную методику проводили с использованием изделия медицинского назначения «Набор сывороток антилейкоцитарных HLA гистотипирующих TY BY 190572781.015-2007 изм. «2»* согласно инструкции по применению «Набор сывороток антилейкоцитарных HLA гистотипирующих», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 03.11.2017.

* Изготовитель ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Республика Беларусь (регистрационное удостоверение № ИМ-7.93535/1710, дата государственной регистрации 30.10.2017 г., действительно до 30.10.2022 г.), регистрационный номер Мн-7.6020/7.003-1706.

Вначале у пациентов определяли фенотип HLA I класса (локусы A, B), далее – наличие антител к антигенам HLA I класса и HPA. Клеточную панель подбирали таким образом, чтобы были максимально представлены все наиболее известные (встречающиеся в популяции на территории Республики Беларусь) HLA-антигены (рис. 1).

Подготовку микрокамер с сывороткой крови реципиента и выделение лимфоцитов выполняли в соответствии с инструкцией по применению «Метод медицинской профилактики рефрактерности к трансфузиям тромбоцитных компонентов крови» [10]. Заполняли бланк фенотипов доноров для определения антител HLA I класса (табл. 1).

2. Проведение ЛЦТ для определения HLA-антител. Всем определенным фенотипам лимфоцитов доноров присваивали порядковые номера от 1 до 24. В каждую лунку панели с 1 мкл образца сыворотки крови пациента добавляли шприцем Гамилтона по 1 мкл взвеси лимфоцитов доноров с известными HLA-фенотипами в концентрации 2×10^6 клеток/мкл в такой последовательности: лимфоциты донора № 1 – в лунки 1A, 1B, 1C; лимфоциты донора № 2 – в лунки 2A, 2B, 2C и т. д. (в лунках 1A–24A – контроль, сыворотка крови человека группы AB(IV)). Инкубировали

Таблица 1
Бланк подбора доноров лимфоцитов для реципиента Ж.Э.А.
Table 1
Selection of lymphocyte donors for the recipient J.E.A.

ДАТА _____
Ф.И.О. реципиента _____
Ф.И.О. и фенотипы доноров _____

1	Д-ч Ю.Н. 2,24/44,62/9	13	П-ц Д.И. 1/8,41/
2	Н-к Т.М. 2/13, 62/6,9	14	С-ь Д.Н. 2,25/51,62/9
3	П-ч А.А. 3,34/7,18/7	15	Б-о Д.В. 1,11/44/5,6
4	Н-в В.И. 1,30/7,8/7	16	И-ч А.А. 1,3/8,35/4
5	Г-в М.А. 1,33/8,14/	17	С-й Н.В. 24,32/35,51/1,4
6	Р-я М.Н. 2,26/38,49/7	18	Х-я Т.С. 11,23/44,55/4,9
7	Ц-й И.С. 2,28/45,62/4	19	К-а О.Н. 1/35,52/6
8	Ш-й А.Г. 1,2/27,62/9,2	20	Ш-ц Д.М. 1,2/57,60/6,10
9	Д-а Е.В. 3,24/14,51	21	Д-в 23,31/38,61/7
10	Г-в П.А. 26/39,49/	22	М-о В.М. 25,29/51,18
11	П-а А.П. 2,11/18,51/7	23	Б-а Е.А. 1,23/37,50/4,6
12	П-в А.П. 3/14,27/1	24	П-а Е.И. 3,32/56,58/1,10

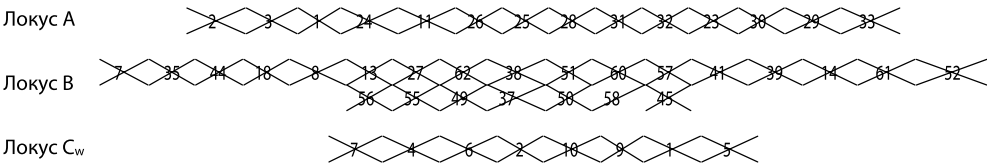


Рис. 1. Панель донорских лимфоцитов с HLA-антигенами I класса в соответствии с распространенностью в популяции Республики Беларусь
Fig. 1. Panel of donor lymphocytes with HLA class I antigens in accordance with the prevalence among the population of the Republic of Belarus



45 минут в термостате при 22 °С. Далее в каждую лунку вносили по 5 мкл кроличьего комплемента стандартного с красителями (акридиновый оранжевый и этидиум бромид). Инкубировали в темноте при температуре 22 °С еще 60 минут. Затем для остановки реакции в лунки вносили по 5 мкл 1%-ного раствора туши. Результаты реакции в «+» учитывали при помощи люминесцентной микроскопии через 5 минут после прекращения реакции или в течение 24 часов при хранении в камере холодильника при 4–8 °С.

3. Интерпретация результатов. Учет производился на инвертированном люминесцентном микроскопе при длине волны 450–490 нм при увеличении $\times 120$.

Для оценки результатов использовали четырехбалльную шкалу соответственно проценту погибших клеток. Положительным результатом считались реакции, оцененные в 3 (75% «погибших») и 4 (100% «погибших») балла. Результаты реакции отмечали в бланк-панели определения антител (рис. 2).

Анализировали фенотипы доноров в лунках, с лимфоцитами которых произошла реакция ЛЦТ с сывороткой пациента (рис. 3).

В ходе анализа были выявлены антигены у доноров 1, 7, 15, 18, к которым имеются антитела в исследуемой сыворотке крови пациента и которые отсутствуют у остальных доноров лимфоцитов (2–6, 8–14, 16, 17, 19–24). Такими антигенами являлись В44 и В45. Эти антигены являются сплитами общей детерминанты В12, т. е. обнаружены HLA-АТ к АГ В 12 (сплит 44+45) (согласно классификации серологических детерминант HLA антигенов класса 1 и 2, info@bag-healthcare.com).

1		4+	4+	13			
2				14			
3				15		4+	4+
4				16			
5				17			
6				18		4+	4+
7		4+	4+	19			
8				20			
9				21			
10				22			
11				23			
12				24			
	A	B	C		A	B	C

Рис. 2. Бланк-панель для регистрации ЛЦТ-теста реципиента Ж.Э.А.
Fig. 2. Results of the reaction of the recipient J.E.A.

1	Д-ч Ю.Н. 2, 24/44, 62/9
7	Ц-й И.С. 2, 28/45, 62/4
15	Б-о Д.В. 1, 11/44/5, 6
18	Х-я Т.С. 11, 23/44, 55/4,9

Рис. 3. Анализ результатов ЛЦТ-теста
Fig. 3. Analysis of agglutination results

4. **Определение НРА-антител.** При отсутствии антител к антигенам системы HLA I класса у пациентов проводили скрининг и определение специфичности анти-тромбоцитных НРА-антител. Данную методику проводили с использованием наборов PAK Plus (GTI Diagnostics, США), предназначенных для определения антител к тромбоцитарным антигенам (НРА) IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa.
5. **Подбор тромбоцитов.** В случае если были выявлены антитела к HLA I класса (после подбора по результатам фенотипирования реципиента по HLA-A и HLA-B локусам I класса), а также при наличии антител к HLA I класса и к НРА совместимость пары «донор – реципиент» определяли путем постановки прямой перекрестной пробы «cross-match» на основе серологического ЛЦТ-теста с учетом систем АВ0 и Rh. При невозможности подбора (полиспецифичность реципиента или экстренный подбор) рекомендовали ТКК, подобранные по АВ0 и Rh системам в дозе, превышающей рассчитанную на процент выявленных антител.
6. **Стандартизация методик.** Проведена работа по валидации методик: исследования антигенов I класса системы HLA (локусов A, B, C) ЛЦТ-тестом, а также исследования антител НРА (к тромбоцитному гликопротеину GP IV) методом качественного твердофазного иммуноферментного анализа. Валидация проведена в соответствии с ТКП 432-2012 (02041) «Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний». На основании полученных данных были составлены отчеты о валидации № ЛТ 04-2020 «Валидация методики скрининга антител к антигенам HLA I класса и НРА (тромбоцитному гликопротеину (GP) IV, полиморфным эпитопам на гликопротеинах тромбоцитов IIb/IIIa, Ib/IX и Ia/IIa) методом качественного твердофазного иммуноферментного анализа».
7. **Выдача ТКК.** Заявку на выдачу совместимых ТКК передавали в отделение комплектования доноров крови, ее компонентов с единым донорским центром для заготовки и отпуска ТКК через отделение хранения и выдачи компонентов крови Центра управления запасами компонентов крови и складом готовой продукции РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения фенотипа антигенов и антител к HLA I класса и НРА у реципиентов представлены в табл. 2.

Результаты исследований определения HLA- и НРА-антител. В результате проведенных исследований у 10 (27%) из 37 пациентов с подозрением на резистентность к трансфузиям ТКК были выявлены антитела к HLA I класса и/или к НРА: у 5 (13,5%) – антитела к HLA I класса, у 2 (5,4%) – антитела анти-НРА. У 3 пациентов выявлены как антитела анти-HLA I класса, так и анти-НРА (табл. 2).

У 27 (72,9%) из 37 пациентов антитела анти-HLA I класса и анти-НРА не были выявлены. Основными диагнозами у этих пациентов были апластическая анемия, острый лейкоз, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, ДВС-синдром, миелодиспластический синдром, септический шок. Предположительно отсутствие прироста уровня тромбоцитов после трансфузии было связано с повышенным потреблением тромбоцитов (ДВС-синдром), спленомегалией или недостаточной продукцией тромбоцитов вследствие гипоплазии костного мозга либо недостаточной функциональной активностью ТКК [13].



Таблица 2
Результаты определения фенотипа антигенов и антител к HLA I класса и HPA у реципиентов (n=37)
Table 2
The results of determining the phenotype of antigens and antibodies to HLA class I and HPA in recipients (n=37)

№ п/п	Ф.И.О.	Пол, ж/м	Дата поступления образца крови	Возраст	Группа кро- ви, резус	Клинико-лабораторная характеристика	Фенотип HLA	HLA A24	HPA A24
1	П.О.П.	ж	11.11.2020	28 лет	B(III) Rh+	Апластическая анемия тяжелой степени, резистентная к иммуносупрессивной терапии, тромбоцитопения (уровень тромбоцитов $6 \times 10^9/l$), геморрагический синдром, вторичный гемосидероз. Ежегодные трансфузии ЭКК и ТКК с 2012 г. Беременность 5-я, 36 недель (Б. I – неразвившаяся в 2017 г., Б. II – наступающая). До операции После операции кесарева сечения и введения 8 доз ТКК	A 3, 28 B 8, 44 C _w 4, 7	АГ A24	отсутствуют
2	С.А.Д.	ж	29.09.2020	11 лет	O(I) Rh+	Апластическая анемия, трехростковая, свертывающее течение, зависимость от ежегодных трансфузий ЭКК и ТКК	A 29 B 7, 41 C _w 7	отсутствуют	отсутствуют
3	Л.П.А.	м	02.10.2020	7 лет	B(III) Rh+	Острый лимфобластный лейкоз, иммунодефицит	A 1, 2 B 52 C _w 7	отсутствуют	отсутствуют
4	Г.Д.П.	ж	21.08.2020	21 год	AB(IV) Rh–	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура. Уровень тромбоцитов до переливания $62 \times 10^9/l$	A 3, 24 B 7, 35 C _w 4, 7	отсутствуют	отсутствуют
5	С.Л.В.	ж	21.08.2020	29 лет	O(I) Rh+	Беременность 34 недели. Спленомегалия, тромбоцитопения	A 25, 19 (30–31) B 13, 18 C _w 6	отсутствуют	отсутствуют

Продолжение таблицы 2

№ п/п	Ф.И.О.	Пол, ж/м	Дата поступления образца крови	Возраст	Группа крови, резус	Клинико-лабораторная характеристика	Фенотип HLA	HLA AT	HPA AT
6	М.А.В.	ж	09.12.2020	33 года	AB(IV) Rh+	Сепсис криптогенный (гемолитический стафилококк), СПОН (полисерозит дыхательных путей, 1–2-я ст. тяж.). Вторичная левосторонняя нижнедолевая пневмония. Анемия смешанного генеза тяж. ст. (железо-, витаминдефицитная, гипопластическая). ДВС II. Тромбоцитопения тяжелой степени. Уровень тромбоцитов $19 \times 10^9/\text{л}$. 21.11.2020 – мед. аборт по медицинским показаниям	A 2, 24 B7 C _w 7, 9	отсутствуют	HPA-1a/1a, 3a/3a, 4a, 1b/1b, 3b/3b (Gp1b/IIIa)
7	И.В.Н.	ж	05.02.2021	28 лет	AB(IV) Rh+	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, хроническое течение. Беременность 16–17 недель, угрожающий выкидыш в 5–6 недель. Уровень тромбоцитов $5 \times 10^9/\text{л}$	A 2, 31 B 60, C _w 7, 10	отсутствуют	отсутствуют
8	Ф.А.Ю.	ж	05.03.2021	35 лет	A(II) Rh+	Роды первые, гемолитическая анемия средней степени тяжести	н. д.	отсутствуют	отсутствуют
9	Ш.У.Д.	ж	31.03.2021	38 лет	A(II) Rh+	Беременность I, 35 недель. Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, хроническое течение. Состояние после спленэктомии в 2020 г. Плоскоклеточный рак шейки матки, стадия не установлена. Неоднократные переливания крови – 4 раза, последний раз в 2010 г., после спленэктомии. Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, хроническое течение с 15 лет. С 2010–2020 гг. уровень тромбоцитов $60\text{--}80 \times 10^9/\text{л}$. Во время беременности тромбоциты с 34 недель, уровень тромбоцитов $8\text{--}9 \times 10^9/\text{л}$	A 2, 11 B 56, 57 C _w 1, 6	отсутствуют	отсутствуют



Продолжение таблицы 2

№ п/п	Ф.И.О.	Пол, ж/м	Дата поступления образца крови	Возраст	Группа крови, резус	Клинико-лабораторная характеристика	Фенотип HLA	HLA AT	HRA AT
10	Ф.Н.Г.	ж	01.04.2021	31 год	O(I) Rh+	Выкидыш, септический шок. Трансфузии: ЭКК	A 25, 11 B 18, 27 C _w 2	отсутствуют	отсутствуют
11	Ф.Л.В.	ж	05.04.2021	67 лет	A(II) Rh+	Апластическая анемия, тяжелое течение. Трансфузии: ЭКК, ТКК	A 2 B 7, 60 C _w 7, 10	отсутствуют	отсутствуют
12	М.А.А.	ж	07.04.2021	29 лет	A(II) Rh+	Апластическая анемия, тяжелое течение	A 31, 32 B 7, 51 C _w 7	отсутствуют	отсутствуют
13	Б.Ю.А.	ж	07.04.2021	23 года	AB(IV) Rh-	Апластическая анемия, тяжелое течение	A 2 B 13, 44 C _w 6, 7	отсутствуют	отсутствуют
14	М.А.В.	ж	07.04.2021	19 лет	A(II) Rh+	Трансфузия ТКК 01.04.2021	A 1, 26 B 7, 8 C _w 7	отсутствуют	отсутствуют
15	Г.М.П.	ж	17.02.2021	40 лет	B(III) Rh+	Термический ожог пламенем головы, шеи, туловища, конечностей S=56% (42%) I-II-III-IV ст. Термоингаляционная травма III ст. Ожоговая болезнь. СПОН. Травма от 27.12.2020	A 3, 11 B 62, 56 C _w 1, 9	к АГ-А2	отсутствуют
16	П.К.М.	м	15.04.2021	4 года	O(I) Rh-	Ювенильный миеломоноцитарный лейкоз. Перед ТКМ	A 1, 2 B 37, 61 C _w 6, 10	к АГ B7+40	отсутствуют
17	С.Г.М.	ж	14.04.2021	44 года	A(II) Rh+	В-клеточная лимфома (Беркитта), IV стадия	A 3, 25 B 18, 56 C _w 1	к АГ 60+61+7+13	HRA к GpIa/Ila
18	Б.М.	м	15.04.2021	5 лет	A(II) Rh-	Острый лимфобластный лейкоз, тромбоцитопения	A 1, 2 B 8, 35 C _w 7	отсутствуют	отсутствуют

Продолжение таблицы 2

№ п/п	Ф.И.О.	Пол, ж/м	Дата поступления образца крови	Возраст	Группа крови, резус	Клинико-лабораторная характеристика	Фенотип HLA	HLA AT	HRA AT
19	Л.Т.М.	ж	03.05.2021	70 лет	B(III) Rh+	Миелодиспластический синдром	A 2, 30 B 13, 60 C _w 6, 10	отсутствуют	отсутствуют
20	М.И.И.	ж	13.05.2021	24 года	–	Аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура (АИТП)	н. д.	отсутствуют	отсутствуют
21	Л.С.А.	м	14.05.2021	4 года	O(I) Rh–	Апластическая анемия, трехростковая, свертываемая, гепатит-индуцированная. Многократные трансфузии тромбоцитов в анамнезе. Аллергические реакции в виде сыпи на трансфузии тромбоцитов	A 11, 23 B 35, 44 C _w 4	отсутствуют	отсутствуют
22	С.Н.Д.	м	26.05.2021	3 года	A(II) Rh+	Острый лимфобластный лейкоз +65 суток после ТТСК	н. д.	отсутствуют	отсутствуют
23	Т.Н.В.	ж	08.06.2021	59 лет	–	Тромбоцитопенический синдром. ОАК от 04.06.2021: Hb – 97 г/л; Эр – $2,71 \times 10^{12}/л$; Тр – $16 \times 10^9/л$; Л – $1,8 \times 10^9/л$, э – 2%, п – 1%; с – 29%; лимф – 61%; м – 7%; СОЭ – 25 мм/ч	A 3, 32 B 27, 44 C _w 2	отсутствуют	отсутствуют
24	К.Е.Е.	ж	08.06.2021	63 года	–	Тромбоцитопенический синдром. ОАК от 03.06.2021: Hb – 126 г/л; Эр – $3,67 \times 10^{12}/л$; Тр – $33 \times 10^9/л$; Л – $10,6 \times 10^9/л$, лимф – 65%, п – 3%, м – 3%, СОЭ – 16 мм/ч	A 1, 29 B 35, 49 C _w 6, 7	отсутствуют	отсутствуют
25	И.И.Р.	м	22.06.2021	12 лет	A(II) Rh+	Тромбоцитопенический синдром. Трансфузия ТКС 18.06.2021: уровень тр. был $5,0 \times 10^9/л$, 21.06.2021 уровень тр. – $12,0 \times 10^9/л$	A 1, 2 B 8, 49 C _w 7	Полиспеци- фичный ответ АТ – 90%	Панреактив- ный ответ, выявлены HRA АТ к GP IIb/IIIa, GP Ia/Ia, GP Ib/IX, GP IV
26	И.А.А.	ж	29.06.2021	1 год 8 мес.	B(III) Rh+	Острый миелоидный лейкоз	A 3, 24 B 35, 60 C _w 10, 4	отсутствуют	отсутствуют



Продолжение таблицы 2

№ п/п	Ф.И.О.	Пол, ж/м	Дата поступления образца крови	Возраст	Группа крови, резус	Клинико-лабораторная характеристика	Фенотип HLA	HLA AT	HRA AT
27	Ж.Э.А.	м	12.07.2021	82 года	AB(IV) Rh+	Рак желудка	A 2, 3 B 7, 8 C _w 7	к АГ В12 (B44+ B45)	GP IIb/IIIa
28	М.С.А	ж	12.08.2021	2 мес.	A(II) Rh-	Химера по системе ABO, Rh. Цирроз печени. Цитомегалический синдром. Митохондриальная болезнь неуточненная. В анамнезе: трансфузия СЗП, обесценной лейкоцитами AB(IV)Rh-, ЭКК отмытые O(I) Rh-, последняя трансфузия ЭКК AB(IV)Rh-. Изоиммунизация плода по Rh-фактору	н. д.	отсутствуют	Панреактивный ответ, выявлены HRA AT к GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP IV
29	Ц.О.А.	ж	16.08.2021	23 года	B(III) Rh+	Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, непрерывно рецидивирующее течение. Геморрагический синдром. Трансфузии ЭКК, ТКК 15.08.2021	н. д.	отсутствуют	отсутствуют
30	А.В.П.	м	28.09.2021	48 лет	B(III) Rh-	Смешанная зарнистоклеточная опухоль правого яичка. 27.09.2021 трансфузия ТКК 250,0	A 3 B 7, 57 C _w 7, 10	отсутствуют	отсутствуют
31	А.Д.Д.	ж	01.12.2021	31 год	A(II) Rh+	Неполный самопроизвольный инфицированный выкидыш. Инфекция COVID-19. Тромбоцитопения	н. д.	АТ к АГ А2	н. д.
32	И.С.В.	м	23.12.2021	9 мес.	-	Лимфома Ходжкина	н. д.	отсутствуют	н. д.
33	Ш.П.В.	м	08.02.2022	15 лет	AB(IV) Rh+	ПИД (синдром Вискотта – Олдрича). Состояние после аллотенной неродственной HLA-совместимой трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Аутоиммунный гемолиз после трансплантации. Хроническая реакция «трансплантат против хозяина». Вирусная инфекция, геморрагический цистит, почечное кровотечение. Массивная трансфузионная поддержка. Иммунная тромбоцитопения (?)	н. д.	отсутствуют	отсутствуют

Окончание таблицы 2

№ п/п	Ф.И.О.	Пол, ж/м	Дата поступления образца крови	Возраст	Группа крови, резус	Клинико-лабораторная характеристика	Фенотип HLA	HLA AT	HPA AT
34	Ж.Д.Ю.	м	21.04.2022	28 лет	AB(IV) Rh-	Острый миелоидный лейкоз (M 0 по FAB-классификации)	н. д.	присутствуют AT (25%)	отсутствуют
35	Д.А.С.	м	21.04.2022	62 года	O(I) Rh+	Острый миелоидный лейкоз (M 2 по FAB-классификации)	н. д.	отсутствуют	отсутствуют
36	Л.Т.С.	ж	12.05.2022	7 лет	B(III) Rh+	Хроническая гранулематозная болезнь. Болезнь Крона. Состояние после ТТСК. Вирусный энцефалит. 10.05.2022 уровень тромбоцитов до переливания: $6 \times 10^9/\text{л}$, переливалось 5 доз. 11.05.2022 через 24 часа – $17 \times 10^9/\text{л}$. 11.05.2022 повторная трансфузия тромбоцитов	н. д.	отсутствуют	отсутствуют
37	Я.А.М.	ж	01.07.2022	17 лет	B(III) Rh+	Острый миелобластный лейкоз	н. д.	отсутствуют	отсутствуют

Примечание: н. д. – исследование фенотипа не проводилось.



Таблица 3

Определение частоты встречаемости антигенов локуса HLA-A

Table 3

Determination of the frequency of occurrence of antigens of the HLA-A group

№ п/п	Ф.И.О.	Антигены локуса HLA-A													
		1	2	3	23	24	25	26	11	29	30	31	32	33	28
1	П.О.П.			+											+
2	С.А.Д.									+					
3	Л.П.А.	+	+												
4	Г.Д.П.			+		+									
5	С.Л.В.						+			+					
6	М.А.В.		+			+									
7	С.Г.М.			+			+								
8	И.В.Н.		+									+			
9	Г.М.П.			+					+						
10	Ш.У.Д.		+						+						
11	Ф.Н.Г.						+		+						
12	Ф.Л.В.		+												
13	М.А.А.											+	+		
14	Б.Ю.А.		+												
15	М.А.В.	+						+							
16	П.К.М.	+	+												
17	Б.М.	+	+												
18	Л.Т.М.		+								+				
19	Л.С.А.				+				+						
20	Т.Н.В.			+										+	
21	К.Е.Е.	+								+					
22	И.И.Р.	+	+												
23	И.А.А.			+		+									
24	Ж.Э.А		+												
Итого		6	11	6	1	2	3	1	4	3	1	2	1	1	1

У реципиентов были выявлены антитела следующей специфичности:

- 1) HLA I класса – к АГ A24 (n=1), к АГ B7+40 (n=1); к АГ A2 (n=2);
- 2) HPA – к АГ 1a/1a, 3a/3a, 4a, 1b/1b (Gp IIb/IIIa) (n=1), к АГ GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP IV (n=1);
- 3) HLA I класса – к АГ B60+61+13+7 и HPA к АГ Gp Ia/IIa (n=1), HLA I класса – к АГ B44+45 и HPA к АГ Gp IIb/IIIa (n=1);
- 4) полиспецифичные: HLA I класса (90%) и HPA к АГ GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP Ia/IIa, GP Ib/IX, GP IV (n=1), HLA I класса (25%) (n=1).

Частота встречаемости антигенов HLA I класса у пациентов с подозрением на резистентность к трансфузиям ТКК. В результате фенотипирования у 24 пациентов была установлена частота встречаемости исследуемых антигенов HLA I класса: группа HLA-A (табл. 3), HLA-B (табл. 4), HLA-C (табл. 5).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, наиболее часто встречающимся антигеном является A2. Данный антиген встречается у 11 реципиентов, что составляет 45,8%. Антигены A1, A3 обнаружены у 6 реципиентов (25%); A11 – у 4 реципиентов

Таблица 4
Определение частоты встречаемости антигенов локуса HLA-B
Table 4
Determination of the frequency of occurrence of antigens of the HLA-B group

№ п/п	Ф.И.О.	Антигены локуса HLA-B																						
		51	52	7	8	44	13	14	62	38	39	57	58	18	49	50	55	56	35	37	60	61	41	27
1	П.О.П.				+	+																		
2	С.А.Д.			+																			+	
3	Л.П.А.		+																					
4	Г.Д.П.			+															+					
5	С.Л.В.						+							+										
6	М.А.В.			+																				
7	С.Г.М.													+				+						
8	И.В.Н.																				+			
9	Г.М.П.								+									+						
10	Ш.У.Д.											+						+						
11	Ф.Н.Г.													+										+
12	Ф.Л.В.			+																	+			
13	М.А.А.	+		+																				
14	Б.Ю.А.					+	+																	
15	М.А.В.			+	+																			
16	П.К.М.																			+		+		
17	Б.М.				+														+					
18	Л.Т.М.						+														+			
19	Л.С.А.					+													+					
20	Т.Н.В.					+																		+
21	К.Е.Е.														+				+					
22	И.И.Р.				+										+									
23	И.А.А.																		+		+			
24	Ж.Э.А.			+	+																			
Итого		1	1	7	5	4	3	0	1	0	0	1	0	3	2	0	0	3	5	1	4	1	1	2

(16,7%); A29, A25 – у 3 реципиентов (12,5%); A24, A31 – у 2 реципиентов (8,3%); A23, A26, A30, A32, A33, A28 – каждый у одного реципиента (4,17%).

Шкала встречаемости антигенов группы HLA-A выглядит следующим образом:
A2 > A3=A1 > A11 > A29=A25 > A24=A31 > A23=A26=A30=A32=A33=A28.

Как видно из данных, представленных в табл. 4, наиболее часто встречающимся антигеном является B7. Данный антиген встречается у 7 реципиентов, что составляет 29,2%. Антигены B35 и B8 встречаются у 5 реципиентов (20,8%); антигены B44 и B60 – у 4 реципиентов (16,7%); B13, B18 и B56 – у 3 реципиентов (12,5%); B27 и B49 – у 2 реципиентов (8,3%); B51, B52, B62, B57, B37, B61 и B60 – у одного реципиента (4,2%). Антигены B14, B39, B38, B58, B50 и B55 не обнаружены ни у одного реципиента.

Шкала встречаемости антигенов группы HLA-B выглядит следующим образом:
B7 > B35=B8 > B44=B60 > B13=B18=B56 > B27=B49 > B37 > B51 > B52 > B62 > B57 > B37 > B61 > B60 > B14=B38=B39=B58=B50=B55.



Таблица 5

Определение частоты встречаемости антигенов локуса HLA-C

Table 5

Determination of the frequency of occurrence of antigens of the HLA-C group

№ п/п	Ф.И.О.	Антигены локуса HLA-CW							
		1	2	9	10	4	5	6	7
1	П.О.П.					+			+
2	С.А.Д.								+
3	Л.П.А.								+
4	Г.Д.П.					+			+
5	С.Л.В.							+	
6	М.А.В.			+					+
7	С.Г.М.	+							
8	И.В.Н.				+				+
9	Г.М.П.	+		+					
10	Ш.У.Д.	+						+	
11	Ф.Н.Г.		+						
12	Ф.Л.В.				+				+
13	М.А.А.								+
14	Б.Ю.А.							+	+
15	М.А.В.								+
16	П.К.М.				+			+	
17	Б.М.								+
18	Л.Т.М.				+			+	
19	Л.С.А.					+			
20	Т.Н.В.		+						
21	К.Е.Е.							+	+
22	И.И.Р.								+
23	И.А.А.				+			+	
24	Ж.Э.А.								+
Итого		3	2	2	5	3	0	7	14

Как видно из данных, представленных в табл. 5, наиболее часто встречающимся антигеном является $C_w 7$. Данный антиген встречается у 14 реципиентов, что составляет 58,3%. Антиген $C_w 6$ обнаружен у 7 реципиентов (29,2%), $C_w 10$ – у 5 (20,8%), $C_w 1$ и $C_w 4$ – у 3 реципиентов (12,5%), $C_w 2$ и $C_w 9$ – у 2 реципиентов (8,3%), $C_w 5$ не обнаружен ни у одного реципиента.

Шкала встречаемости антигенов группы HLA-C выглядит следующим образом:

$$C_w 7 > C_w 6 > C_w 10 > C_w 1 = C_w 4 > C_w 2 = C_w 9 > C_w 5.$$

Таким образом, у пациентов с подозрением на рефрактерность шкала встречаемости значимых антигенов HLA I класса совпадает со шкалой распространенности данных антигенов в популяции Республики Беларусь: в локусе А – антигены A2 и A3, в локусе В – антигены B7, B35 и B13, в локусе С – антигены C7 и C5.

Таблица 6
Специфичность выявленных антител к HLA I класса
Table 6
Specificity of detected anti-HLA I antibodies

№ п/п	Ф.И.О.	HLA-A						HLA-B								HLA-C							Анти- HLA-AT
		1	2	3	25	11	28	8	44	7	62	18	56	37	49	1	9	10	4	6	7		
1	П.О.П.			+			+	+	+										+		+	A24	
2	Г.М.П.			+		+					+		+			+	+					A2	
3	А.Д.Д.*																					A2	
4	С.Г.М.			+	+							+	+			+						B60+61+ 7+13	
5	П.К.М.	+	+											+				+		+		B7+40	
6	И.И.Р.	+	+					+							+						+	п/с	
7	Ж.Э.А.		+	+				+		+											+	B44+45	
8	Ж.Д.Ю.*																					п/с	

Примечания: п/с – полиспецифичность; * фенотип не определялся.

Подбор ТКК для пар «донор – реципиент»

HLA-антитела были выявлены у 8 человек из 37, что составило 21,6% (табл. 6).

Из анализа данных, представленных в табл. 6, установлено, что антигены A3, B8 и C_w 7 были обнаружены у 3 (60,0%) реципиентов; A1 и A2 обнаружены у 2 реципиентов (40%).

Для 6 пациентов проведен подбор пар «донор – реципиент» и оценена его клиническая эффективность. Для 4 пациентов с выявленными антителами к HLA I класса проводился подбор совместимых ТКК по результатам фенотипирования по HLA-A и HLA-B локусам I класса и по системам AB0 и Rh с проведением «cross-match» теста на совместимость донора с реципиентом. В одном случае были обнаружены антитела только к системе HPA и проводили индивидуальный подбор пары «донор – реципиент» по системам AB0 и Rh с проведением «cross-match» теста на совместимость.

У одного пациента с полиспецифичностью антител к HLA I класса и к HPA (90%) ТКК назначили в дозе, превышающей рассчитанную на процент выявленных анти-тромбоцитарных антител с учетом совместимости по антигенам AB0 и Rh и проведением «cross-match» теста на совместимость донора с реципиентом на основе ЛЦТ.

Пример подбора пар «донор – реципиент»

Пациент Ж.Э.А., муж., 81 год.

Группа крови, резус: AB(IV), Rh+.

Фенотип реципиента HLA I класса: A2, A3; B7, B8; C_w 7.

Выявлены антитела HLA I класса к АГ B12 и HPA к GP IIb/IIIa.

Из 6 доноров, подходящих по AB(IV) Rh+, были отобраны 2 донора с фенотипами HLA: донор 1 – A2, A25; B18, B57; C_w 6 и донор 2 – A25, A26; B18, B49; C_w 7 (с отсутствием у донора антигена HLA B12, к которому выявлены антитела у пациента). После проведения «cross-match» теста между сывороткой реципиента и лимфоцитами донора проведена трансфузия.



Оценку клинико-лабораторной эффективности после проведения трансфузий ТКК проводили на основании абсолютного прироста тромбоцитов (АПТ), рассчитанного через 24 часа после трансфузии, с указанием переливаемых доз ТКК до и после подбора (табл. 7). У 5 реципиентов после подбора ТКК отмечались прекращение спонтанной кровоточивости, отсутствие свежих геморрагий на коже и видимых слизистых, лабораторный прирост уровня тромбоцитов.

Отмечено, что у 6 реципиентов с антитромбоцитными антителами при введении неподобранных доз ТКК средний уровень тромбоцитов составил $31,1 \pm 15,2 \times 10^9/\text{л}$, что было ниже необходимого гемостатического уровня (более $50 \times 10^9/\text{л}$). После подбора совместимых доз ТКК средний уровень тромбоцитов через 24 часа повысился до гемостатического уровня и составил $71,1 \pm 11,4 \times 10^9/\text{л}$, что указывает на достаточную эффективность подобранных ТКК.

Таблица 7

Показатели АПТ, рассчитанного через 24 часа у аллоиммунизированных пациентов после подбора совместимой трансфузии ТКК

Table 7

Absolute increase in the number of platelets calculated after 24 hours in patients alloimmunised with antiplatelet antibodies after selection of a compatible platelet components of blood transfusion

№ п/п	Ф.И.О. пациента, пол, возраст	HLA AT	HPA AT	PLT, $\times 10^9/\text{л}$, до подбора	PLT, $\times 10^9/\text{л}$, через 24 часа после совместимой трансфузии ТКК	Кол-во совместимых доз ТКК	АПТ**, $\times 10^9/\text{л}$, после трансфузии ТКК
1	2	3	4	5	6	7	8
1	П.О.П., ж, 28 лет	A24	—*	6	57	Перед операцией 8 доз***	51
		A24	—	31	55	После операции кесарева сечения 4 дозы	24
2	М.А.В., ж, 33 года	—	1a/1a, 3a/3a, 4a, 1b/1b, 3b/3b (Gp IIb/IIIa)	19	66	6 доз	47
3	Г.М.П., ж, 40 лет	A2	—	14	46	10 доз	32
4	П.К.М., м, 4 года	B7+B40	—	28	73	2 дозы	45
5	И.И.Р., м, 12 лет	Полиспецифичный ответ AT – 90%	Полиспецифичный ответ HPA AT к GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa, GP Ib/IX, GP IV	7	70	4 дозы	63
6	Ж.Э.А., м, 81 год	B44+45	GP IIb/IIIa	113	131	4 дозы	18

Примечания: * «—» – AT отсутствуют; ** АПТ – абсолютный прирост тромбоцитов, через 24 часа после подбора совместимой трансфузии ТКК; *** 1 доза – 50 мл ТКК с числом тромбоцитов $50-70 \times 10^9/\text{л}$.

Таким образом, современные подходы позволяют выявить иммунный конфликт по антигенам тромбоцитов, осуществить доказательный индивидуальный подбор пар «донор – реципиент» при резистентности к трансфузиям ТКК, достичь гемостатического эффекта, особенно при многократных трансфузиях ТКК. Подобная тактика позволяет обеспечить безопасность (снизить риск дальнейшей аллоиммунизации) и снизить затраты на трансфузионную терапию.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований у 10 (27%) из 37 пациентов были выявлены антитела к HLA I класса и/или к HPA. У 5 из 37 (13,5%) пациентов выявлены антитела к HLA I класса, у 2 (5,4%) реципиентов – антитела к HPA и у 3 (8,1%) – антитела и к HLA I класса, и к HPA. У 27 (72,9%) из 37 пациентов антитела к HLA I класса и к HPA не были выявлены, у них причина неэффективности трансфузии ТКК имела другой генез.

У реципиентов были выявлены антитела следующей специфичности:

- 1) HLA I класса – к АГ A24 (n=1), к АГ B7+40 (n=1); к АГ A2 (n=2);
- 2) HPA – к АГ 1a/1a, 3a/3a, 4a, 1b/1b (Gp IIb/IIIa) (n=1), к АГ Gp IIb/IIIa, Gp Ia/IIa, Gp IV (n=1);
- 3) HLA I класса – к АГ B60+61+13+7 и HPA к АГ Gp Ia/IIa (n=1), HLA I класса – к АГ B44+45 и HPA к АГ Gp IIb/IIIa (n=1);
- 4) полиспецифичные: HLA I класса (90% антител) и HPA к АГ Gp IIb/IIIa, Gp Ia/IIa, Gp Ia/IIa, Gp Ib/IX, Gp IV (n=1), HLA I класса (25% антител) (n=1).

Шкалы встречаемости антигенов не отличаются от шкалы встречаемости антигенов HLA в популяции по территории Республики Беларусь.

Для 6 пациентов проведены подбор пар «донор – реципиент» и оценка клинико-лабораторной эффективности трансфузий ТКК. Клинико-лабораторная эффективность подобранных трансфузий ТКК отмечалась в 100% случаев, средний прирост в группе был на $40,0 \pm 6,5 \times 10^9/\text{л}$ и достиг гемостатического уровня – $71,1 \pm 11,4 \times 10^9/\text{л}$.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Landau M., Rosenberg N. Molecular insight into human platelet antigens: structural and evolutionary conservation analyses offer new perspective to immunogenic disorders. *Transfusion*. 2011;51:558–569. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02862
2. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation of October 20, 2020 № 1134n "On approval of the procedure for medical examination of the recipient, testing for individual compatibility, including a biological sample, during transfusion of donor blood and (or) its components". (in Russian)
3. Mineeva N.V., Krobinets I.I., Blinov M.N. Platelet antigens and antibodies. Literature review. *Oncohematology*. 2013;3:60–68. doi: 10.17650/1818-8346-2013-8-3-60-68. (in Russian)
4. Golovkina L.L. Platelet antigens and their medical significance. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2010;55(4):24–31. (in Russian)
5. Brand A. Immunological complications of blood transfusions. *Presse médicale*. 2016;45(7–8):e313–24. doi: 10.1016/j.lpm.2016.06.024
6. Pavenski K., Freedman J., Semple J.W. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management. *Tissue Antigens*. 2012;79(4):237–245. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01852.x
7. Rakhmani A.F., Mikhaylova E.A., Dubinkin I.V. Tactics of platelet transfusion therapy in patients with depression of the hematopoiesis: review. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2017;62(4):218–222. doi: 10.18821/0234-5730-2017-62-4-218-222. (in Russian)
8. Inoue H., Sakamoto R., Nishimiya H. Minor impact of patient alloantibodies against human platelet antigen (HPA)-15 in the effectiveness of platelet transfusion: A pilot study. *Transfusion*. 2021;61(3):738–743. doi: 10.1111/trf.16181
9. Ameri Z., Vahidi R., Khaleghi M. Slot blotting and flow cytometry: two efficient assays for platelet antibody screening among patients with platelet refractoriness. *Vox Sanguinis*. 2021;116(1):106–115. doi: 10.1111/vox.12988
10. Dashkevich E.V., Semenov G.V., Peshnyak J.V. Method of medical prevention of refractoriness to transfusions of platelet blood components: guidelines for use. Minsk: Ministry of health of the Republic of Belarus. Reg. No. 112-1021, dated 08.12.2021; 11 p. (in Russian)
11. Fagundes I.S., Franz J.M., Jobim M.S. Diagnosis and treatment of immunological platelet refractoriness by histocompatibility. *Human Immunology*. 2020;81(5):197–201. doi: 10.1016/j.humimm.2020.02.005
12. Revelli N., Villa M.A., Olivero B. A real-life evaluation of two platelet cross-matching programmes for the treatment of patients refractory to platelet transfusions. *Vox Sanguinis*. 2019;114(1):73–78. doi: 10.1016/j.humimm.2020.02.005
13. Dashkevich E.V., Peshnyak Zh.V., Goncharova N.V., Repin L.A., Buchwald N.A. Characterization of platelet components of blood obtained by automatic apheresis, depleted in leukocytes, pathogen-reduced taking into account the phenotypic and functional characteristics of platelets. *Transfusiology*. 2022;23(1):22–36.