

На правах рукописи

**КРОБИНЕЦ**

Ирина Ивановна

**МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ  
ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ТРАНСФУЗИЙ  
КОМПОНЕНТОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С  
ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ**

14.01.21 – гематология и переливание крови

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург  
2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

**Научные консультанты:**

**Минеева Наталья Витальевна**, доктор биологических наук, профессор  
**Сидоркевич Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук

**Официальные оппоненты:**

**Хамаганова Екатерина Георгиевна**, доктор биологических наук  
заведующий лабораторией тканевого типирования Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Баховадинов Бурхонидин Баховадинович**, доктор медицинских наук,  
профессор, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Парамонов Игорь Владимирович**, доктор медицинских наук, директор  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании специализированного совета (шифр Д.208.074.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства России» (193024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России ([www.bloodscience.ru](http://www.bloodscience.ru))

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор медицинских наук

Т.В. Глазанова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования.

В последние десятилетия отмечается значительный прогресс в терапии гематологических заболеваний, связанный с широким использованием новых методов диагностики и лечения при оказании медицинской помощи пациентам с заболеваниями системы крови. При этом трансфузионная терапия по-прежнему остается важной составляющей комплексного лечения гематологических больных [Романенко Н.А., 2010; Савченко В.Г., 2014; Harm S.K., 2014; Грицаев, С. В., 2014; Чечеткин А. В., 2016; Бессмельцев С.С., 2018; Афанасьев Б.В., 2019; Певцов Д.Э., 2020]. Главной опасностью данного вида терапии являются посттрансфузионные осложнения (ПТО), обусловленные как индивидуальными особенностями подбора пары донор-реципиент, так и возможными ошибочными действиями медицинского персонала [Румянцев А.Г., 2002; Шевченко Ю.Л., 2003; Пашкова И.А., 2014; Эйхлер О.В., 2018; Минеева Н.В., 2020]. Основным методом исследования в лабораториях по обследованию доноров и реципиентов крови и ее компонентов является серологическое типирование, которое имеет ряд ограничений [Донсков С. И., 2011; Минеева Н. В., 2020].

В современной системе обеспечения иммунологической безопасности большое внимание уделяется профилактике ПТО гемолитического типа. Однако, наличие аутоантител, аллоантител редких специфичностей, перекрестно-реагирующих антител к антигенам эритроцитов, трансфузионный химеризм у пациентов с множественными трансфузиями, индивидуальные генетические особенности (слабо экспрессируемые антигены) и отсутствие или низкое качество серологических реактивов существенно затрудняют подбор пар донор-реципиент [Bianco-Miotto T., 2009; Zalpuri S., 2012; Scharberg E.A., 2015; Nambiar R. K., 2017; Каландаров Р.С., 2017; Йовдий А.В., 2019; Бутина Е.В., 2019]. В дополнение к этому, разработка и внедрение в практику новых препаратов на основе моноклональных антител для лечения онкогематологических пациентов сопровождается рядом неизвестных ранее проблем при проведении трансфузионной терапии. Образцы крови пациентов, которым проводили лечение, часто дают положительные реакции агглютинации в прямом и непрямом антиглобулиновых тестах, что затрудняет интерпретацию результатов иммуногематологических исследований [С.І. Шарцу, 2015; Н. Quach, 2018; Головкина Л.Л., 2018; Бессмельцев С.С., 2018]. Существующие технологии не всегда способны решить эти проблемы, и подбор гемокомпонентов для таких пациентов относится к категории сложно диагностируемых случаев [L.Y. Wang, 2006; M. Karimi, 2007; Минеева Н.В., 2015; Минеева Н.В., 2020]. Однако, в современных нормативных документах не представлены алгоритмы индивидуального подбора гемокомпонентов и проведения исследований антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител в сложно диагностируемых случаях.

Таким образом, применяемые иммуногематологические методы требуют совершенствования, в том числе за счет внедрения молекулярно-генетических методов типирования в лабораторную службу гематологической клиники.

Наряду с ПТО гемолитического типа не менее важными являются ПТО негемолитического типа, обусловленные несовместимостью по антигенам тромбоцитов (Human Platelet Antigens – HPA), лейкоцитов ( Human Leucocyte Antigens – HLA) [Пашкова И.А., 2014; Глазанова Т.В., 2015; Бубнова Л.Н., 2017; Старикова О.С., 2021] и нейтрофилов (Human Neutrophil Antigens – HNA) [Reil A., 2008; Clay M.E., 2010; Cardoso S.P., 2013; Simtong P., 2017; Lopes L.B., 2018]. Причиной их возникновения являются аллоиммунные антитела к антигенам этих систем у донора или реципиента, которые вырабатываются во время беременности или трансфузии компонентов крови [Davoren A., 2003; Fontaine M. J., 2006; Reil A., 2008; Chapman C., 2009; Looney M. R., 2014; Bayat V., 2015]. Однако, если популяционные особенности антигенов эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов (HLA) и антител к ним изучены достаточно подробно [Донсков С.И., 2011; Елов А.В., 2011; Головкина Л.Л., 2012; Бутина Е.В., 2019; Логинова М.А., 2020; Минеева Н.В., 2020], то данные об особенностях распределения HNA и антител в нашей стране крайне ограничены.

Методы на основе ПЦР являются оптимальными для типирования HNA-1,-3,-4,-5 [Clay M.E., 2010], однако часто не используются в связи с отсутствием регламентирующих документов и тест-систем для типирования HNA от отечественных производителей. В связи с этим особую значимость представляет разработка отечественных реагентов для HNA-типирования и изучение популяционных особенностей распределения HNA у доноров и пациентов РФ.

В литературных данных существует ограниченное количество проспективных скрининговых исследований по выявлению анти-HNA аллоантител [Gottschall J.L., 2011; Xia W., 2015]. Сведения о частоте встречаемости аллоантител к HNA у доноров крови и ее компонентов в РФ отсутствуют.

Стандартными методами выявления анти-HNA антител являются тест агглютинации гранулоцитов (granulocyte agglutination test – GAT) и тест иммунофлуоресценции гранулоцитов (granulocyte immunofluorescence test – GIFT). Для идентификации антител используется метод иммобилизации антигенов гранулоцитов специфическими моноклональными антителами (monoclonal antibody immobilization of granulocyte specific antigens – MAIGA). Однако исследования стандартными методами требуют существенных затрат времени и являются технически сложными, а также требуют изоляции гранулоцитов, которая часто сопровождается большой потерей клеток. Современные технические возможности, в том числе проточная цитофлуориметрия, позволяют разрабатывать новые, более информативные и менее трудоемкие методы исследования для диагностики иммуноконфликта.

В связи с этим представляется актуальным разработать методику для выявления антител к HNA и оценить уровень HNA-аллоиммунизации доноров и реципиентов крови и ее компонентов.

В мировой практике широко используются методы диагностики иммунных конфликтов по антигенам эритроцитов, тромбоцитов (HРА) [Пашкова И.А., 2002; Бутина Е.В., 2016]., и мало работ, посвященных лабораторной диагностике нейтропении, обусловленной антинейтрофильными антителами [Kaplan С., 2010; Минеева Н.В., 2011; Juul S., 2012; Daniels G., 2018].

Алгоритм ее диагностики с описанием современных методов исследования в настоящее время в нашей стране не разработан.

Наряду с аллоиммунизацией, актуальной проблемой является аутосенсбилизация, которая может быть причиной развития как самостоятельного заболевания, так и осложнять течение ряда онкогематологических заболеваний. Наиболее известными из них являются гемолитическая анемия и тромбоцитопения [Visco С., 2008; Dearden С., 2008; Cines D.В., 2009; Zent С. S., 2010; Бутина Е.В., 2014]. В литературе встречается мало работ, посвященных аутоиммунной нейтропении, ассоциированной с повышенным риском развития инфекционных осложнений, и препятствующей проведению программной химиотерапии с соблюдением дозировки и регулярности введения химиопрепаратов. Несмотря на значимость оценки аутосенсбилизации антигенами нейтрофилов, в России до настоящего времени эти исследования не проводились.

Таким образом, актуальность работы обусловлена необходимостью совершенствования иммунологической безопасности при комплексном лечении гематологических пациентов путем внедрения современных методов типирования антигенов и выявления антител, в том числе с использованием оригинальных разработанных подходов. Это позволит повысить эффективность системы диагностики и профилактики осложнений, связанных с трансфузиями компонентов крови.

### **Степень разработанности темы**

В РФ активно проводятся исследования по вопросам обеспечения безопасности трансфузионной терапии, особенности технологий для сочетанного донорства [Киселева Е.А., 2021], трансфузионного обеспечения при аллогенных трансплантациях гемопоэтических стволовых клеток [Кучер М.А., 2018], формирования регистров доноров ГСКК [Логинова М.А., 2021], вопросы иммунологической безопасности с учетом антигенов эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов (HLA) [Пашкова И.А., 2014; Бутина Е.В., 2019]. Неизученными остаются вопросы иммунологической безопасности с учетом антигенов нейтрофилов (HNA). Несмотря на важность определения антител к антигенам нейтрофилов для диагностики этиологии нейтропении и выбора тактики лечения больных, в России до настоящего времени эти исследования не проводятся. Нет единого мнения касательно выбора метода исследования

антигенов HNA и антител к ним. Не разработаны алгоритмы исследования антиэритроцитарных антител в сложно диагностируемых случаях, а существующие методические подходы к определению антител у пациентов с множественной миеломой, получающих терапию моноклональными антителами анти-CD38 [Головкина Л.Л. с соавт., 2018; Quach H. et al., 2018], не всегда способны решить поставленные задачи, что требует поиска новых путей решения данной проблемы.

### **Цель исследования**

Разработка научно-методических и молекулярно-биологических подходов к выявлению антигенов и антител к эритроцитам и нейтрофилам для обеспечения безопасности трансфузий компонентов крови у пациентов с гематологическими заболеваниями.

### **Задачи исследования**

1. Определить особенности распределения антигенов системы HNA нейтрофилов и оценить риск HNA-аллоиммунизации доноров и пациентов с гематологическими заболеваниями.

2. Усовершенствовать метод выявления антител к антигенам HNA с использованием проточной цитофлуориметрии и определить уровень аллоиммунизации у доноров и реципиентов крови и ее компонентов.

3. Разработать алгоритм лабораторной диагностики иммунной нейтропении и определить уровень аутоенсибилизации к антигенам систем HNA у пациентов с нейтропенией.

4. Установить причины сложности интерпретации результатов исследований антигенов эритроцитов систем ABO и Rh и антител к ним у пациентов с гематологическими заболеваниями.

5. Оценить эффективность применения молекулярно-генетического типирования групп крови эритроцитов у реципиентов с трансфузионным химеризмом для уточнения результатов серологических исследований.

6. Разработать алгоритмы скрининга аллоиммунных антител к антигенам эритроцитов в сложных случаях у пациентов с гематологическими заболеваниями и оценить эффективность подбора трансфузионных сред, в том числе у пациентов с множественной миеломой.

7. Определить особенности выявления антиэритроцитарных аллоиммунных антител у больных множественной миеломой, получающих терапию лекарственными моноклональными антителами анти-CD38 и разработать алгоритм скрининга антител.

### **Научная новизна**

Разработан оригинальный метод генотипирования, предназначенный для определения HNA-генотипа доноров крови и пациентов с гематологическими

заболеваниями, основанный на полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени.

Получены новые научные данные об особенностях распределения HNA-аллелей и генотипов у доноров крови и пациентов с гематологическими заболеваниями Северо-Западного региона России, расширяющие медико-биологические основы обеспечения безопасности трансфузий компонентов крови у пациентов.

Впервые проведена оценка уровня HNA-аллоиммунизации у доноров и реципиентов крови и ее компонентов с использованием разработанного нового методического подхода к выявлению HNA-антител.

Разработан алгоритм определения характера впервые выявленной иммунной нейтропении, в том числе у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями.

Доказано, что основными причинами сложности интерпретации результатов исследований антигенов эритроцитов систем ABO и Rh и антител к ним у пациентов с гематологическими заболеваниями являются снижение экспрессии антигенов эритроцитов систем ABO, Rh и концентрации анти- A, анти-B антител, наличие двойных популяций, аллоиммунных, аутоиммунных и перекрестно-реагирующих антител к антигенам эритроцитов.

Установлено, что у реципиентов с трансфузионным химеризмом достоверность определения групп крови эритроцитов с применением молекулярно-генетического типирования значимо выше, чем при использовании серологического типирования.

Впервые разработан алгоритм скрининга антиэритроцитарных антител у пациентов с множественной миеломой, получающих терапию даратумумабом, с использованием диагностического реагента моноклональных антител (МА) CD38, позволяющий сохранить экспрессию антигенов эритроцитов и выявить в непрямом антиглобулиновом тесте клинически значимые антитела к трансфузионно опасным антигенам систем групп крови эритроцитов.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Разработана и апробирована методика генотипирования, предназначенная для выполнения исследований по HNA-типированию, основанная на полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени, позволившая получить новые данные об особенностях распределения HNA-аллелей и генотипов у доноров крови и пациентов с гематологическими заболеваниями, может быть использована в иммуногематологических лабораториях для диагностики и профилактики аллоиммунных конфликтов.

Предложенный методический подход к выявлению антител к антигенам систем HNA позволяет провести дифференциальную диагностику причин нейтропении у пациентов с первично выявленной нейтропенией, а также у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями.

Показана необходимость использования молекулярно-генетических методов типирования групп крови эритроцитов у реципиентов с трансфузионным химеризмом, что позволяет обеспечить иммунологическую безопасность гемотрансфузионной терапии.

Разработанные алгоритмы скрининга антиэритроцитарных антител позволяют выявить антитела в сложных случаях, дифференцировать перекрестно-реагирующие антитела, не имеющие клинического значения, и аутоиммунные и/или аллоиммунные антитела, имеющие клиническое значение, в том числе у пациентов с множественной миеломой, получающих терапию анти-CD38 моноклональными антителами. Использование предлагаемых алгоритмов позволяет осуществлять подбор совместимых донорских эритроцитарных компонентов реципиентам с гематологическими заболеваниями.

Результаты исследования использованы при подготовке методических указаний «Иммуногематологическое обследование доноров крови и (или) её компонентов и реципиентов» (утв. ФМБА России, 2017), методического пособия «Алгоритмы индивидуального подбора гемокомпонентов и проведения исследования антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител в сложно диагностируемых случаях» (утв. ФМБА России, 2018), методики «Методика ДНК-типирования антигенов нейтрофилов ПЦР в реальном времени» (утв. ФМБА России, 2019), методики «Методика диагностики антител к антигенам гранулоцитов» (утв. ФМБА России, 2020).

Разработанные методы диагностики внедрены в практическую деятельность Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России). Теоретические положения и практические результаты диссертационного исследования используются в образовательной деятельности ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Разработан оригинальный алгоритм скрининга аллоантител у больных множественной миеломой, получающих терапию анти-CD38 моноклональными антителами, который позволяет дифференцировать лекарственные анти-CD38 антитела и антиэритроцитарные клинически значимые аллоиммунные антитела.

Ноу-хау Метод выявления ауто/аллоантител к антигенам нейтрофилов методом проточной цитофлуориметрии: №388-03-168 от 04.02.16, №388-03-088 от 30.01.2017, №388-03-2018-181 от 29.01.2018. Заказчик: ФМБА России Исполнитель ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России.

Заявка о выдаче патента на изобретение № 2021112324 от 27.04.2021 «Способ диагностики иммунной нейтропении».

Заявка о выдаче патента на изобретение № 2021138610 от 22.12.2021 «Способ определения аллоиммунных антиэритроцитарных антител у больных множественной миеломой».



## **Методология и методы исследования**

Материалом исследования являлись образцы крови 3500 доноров и 2610 пациентов, которым было выполнено 36585 и 12571 исследование, соответственно. В работе использованы иммуногематологические, основанные на реакции агглютинации, метод проточной цитофлуориметрии, молекулярно-генетические, статистические методы исследования; методы научного анализа: проспективный и ретроспективный анализ; методы математической статистики.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработанная методика, основанная на полимеразной цепной реакции, для HNA-типирования обладает высокой аналитической чувствительностью и специфичностью и позволяет определять частоту встречаемости антигенов системы HNA и оценивать риск HNA-аллоиммунизации у пациентов с гематологическими заболеваниями.

2. Разработанный метод выявления антител, основанный на технологии проточной цитофлуориметрии, дает возможность оценить уровень аутосенсibilизации и аллоиммунизации к антигенам систем HNA у доноров и реципиентов крови и ее компонентов. Предложенный алгоритм диагностики иммунных нейтропений позволяет выявлять различия в генотипах систем HNA и дифференцировать аутоиммунные и аллоиммунные антитела к антигенам систем HNA.

3. Снижение экспрессии антигенов эритроцитов систем ABO и Rh, концентрации анти-А, анти-В антител, наличие двойных популяций, алло-, ауто- и перекрестно-реагирующих антител являются основными причинами ошибок при интерпретации результатов серологических исследований у пациентов с гематологическими заболеваниями.

4. Молекулярно-генетическое типирование групп крови эритроцитов реципиентов с трансфузионным химеризмом является эффективным методом для подбора совместимых донорских эритроцитных компонентов для трансфузий.

5. Разработанные алгоритмы проведения скрининга антиэритроцитарных аллоантител у больных с заболеваниями системы крови позволяют дифференцировать перекрестно-реагирующие антитела, не имеющие клинического значения, и аутоиммунные и/или аллоиммунные антитела, имеющие клиническое значение, а также идентифицировать специфичность антиэритроцитарных аллоантител у пациентов с аутоиммунными антиэритроцитарными антителами.

6. Предложенный алгоритм скрининга и идентификации антиэритроцитарных аллоиммунных антител у пациентов с множественной миеломой, позволяет дифференцировать лекарственные анти-CD38 антитела и антиэритроцитарные аллоиммунные антитела, имеющие клиническое значение, и таким образом повысить эффективность индивидуального подбора эритроцитных компонентов.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным количеством объектов исследования (2610 пациентов с гематологическими заболеваниями, и 3500 доноров крови и ее компонентов, 10 панелей тест-эритроцитов для диагностики аллоантител к антигенам эритроцитов), использованием современных информативных методов лабораторных исследований (выполнено 12571 исследование образцов крови пациентов и 36585 исследований образцов крови доноров), статистической обработкой полученных результатов, адекватной задачам исследования.

Основные материалы исследования представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая лабораторная диагностика в гематологии и службе крови», (г. Санкт-Петербург, 27-28 марта 2014 г.), IV Конгрессе гематологов России (г. Москва, 12-14 апреля 2018 г.), 35-ом Международном Конгрессе Международного общества по переливанию крови (ISBT) (Торонто, Канада, 2-6 июня 2018 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии», (Санкт-Петербург, 30-31 мая 2019 г.), 29-м Региональном Конгрессе Международного общества по переливанию крови (ISBT) (Базель, 22-26 июня 2019 г.), 25-м Конгрессе Европейской ассоциации гематологов (ЕНА) (11 июня 2020 – 15 октября 2020 г.), XIV Международном симпозиуме памяти Р. М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия», (г. Санкт-Петербург, 16-19 сентября 2020 г.), 36-м Региональном Конгрессе Международного общества по переливанию крови (ISBT) (12 – 16 декабря 2020 г.), 31-м региональном виртуальном конгрессе Международного общества по переливанию крови (ISBT in Focus) (2-8 июня 2021 г.), IX-ой Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы трансфузионной терапии» (г. Нур-Султан, Казахстан, 16-18 марта 2021 г.).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 34 печатные работы, в том числе 15 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации для публикации результатов диссертационных исследований.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Автор принимала непосредственное участие в формулировке цели и задач, выполнении иммуногематологических, молекулярно-генетических исследований, разработке всех протоколов исследований, анализировала полученные результаты, осуществляла написание и оформление рукописи. Процент личного участия в выполнении работы составляет 80%.

## **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 216 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части, включающей в себя обзор литературы, материалы и методы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, содержащего 266 источников, из которых 59 отечественных и 207 зарубежных. Работа иллюстрирована 43 рисунками и 40 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Материал и методы исследования.** Исследование выполнено в период с 2014 по 2021 г. на базе лаборатории изосерологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства».

Определение антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител проводили в соответствии с действующими на момент обследования регламентирующими документами: Постановлением Правительства РФ от 31 декабря 2010 г. №1230 «Об утверждении правил и методов исследований и правил отбора образцов донорской крови, необходимых для применения и исполнения технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии», приказом МЗ РФ от 2 апреля 2013 г. N 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов» и Постановлением Правительства РФ от 22 июня 2019 г. N 797 "Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации".

Материалом исследования явились результаты обследования 3500 доноров крови и 2610 пациентов с гематологическими заболеваниями. Всего было выполнено 12571 исследование образцов крови пациентов и 36585 исследований образцов крови доноров. Возраст пациентов варьировал от 21 до 87 лет, медиана - 62 года.

Для разработки оригинального метода типирования генов, кодирующих антигены HNA, материалом исследования служили образцы ДНК, выделенной из периферической венозной крови 400 доноров крови и ее компонентов и 375 пациентов с гематологическими заболеваниями. Молекулярное-генетическое типирование проводили методом аллель-специфичной ПЦР в режиме реального времени с использованием оригинальных праймеров. Для экстракции ДНК применяли классический жидкофазный метод, предполагающий использование СТАВ (cetyltrimethylammonium bromide) – бромистого цетилтриметиламмония.

Аллоиммунные антитела к антигенам HNA определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием оригинальной разработанной методики. Для выявления основных популяций лейкоцитов использовали моноклональные антитела CD16, CD45, CD19. В качестве вторичных антител

использовали антитела Goat F(ab')<sub>2</sub> Anti-Human IgG (Beckman Coulter, США). Исследование проводили в образцах крови 1127 доноров, из которых было 635 доноров-мужчин и 492 доноров-женщин. Доноры-женщины в возрасте 18-30 лет составили 36,18% (n=178), в возрасте 30-60 лет – 63,82% (n=314). Все обследованные доноры не имели в анамнезе трансфузий компонентов крови.

Аутосенсibilизацию антигенами HNA оценивали в образцах крови 347 пациентов с ХЛПЗ с нейтропенией (ММ, n= 201; ХЛЛ, n= 69; ЛХ, n= 11; НХЛ, n=65; волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), n= 10). Исследование аутоантител к нейтрофилам проведено в образцах крови 1161 пациента, направленных в консультативно-диагностическое отделение института по поводу впервые выявленной нейтропении неясного генеза с 2016 по 2021год, из которых было 569 пациентов в возрасте 18-81 (медиана 62) и 592 пациента - дети. Последние были условно разделены по возрастным группам: до 1 года (n= 271), 1-5 лет (n= 182), 5-18 лет (n= 139). Выявление антител к антигенам нейтрофилов проводили в прямом тесте методом проточной цитофлуориметрии с использованием оригинальной методики.

Для анализа результатов иммуногематологических исследований антител и антигенов эритроцитов систем АВО и Резус в исследование были включены образцы крови 1153 пациентов с гематологическими заболеваниями: ММ (n=291), ХЛЛ (n=216), лимфома (n=137), ИП (n=90), ХМЛ (n=180), ПМФ (n=42), МДС (n=77), ОЛЛ (n=41), ОМЛ (n=79).

Анализ интерпретации результатов скрининга антиэритроцитарных антител проводили в образцах крови 1260 пациентов с гематологическими заболеваниями: ММ (n=291, 36 из которых получали терапию лекарственным препаратом даратумумаб), ХЛЛ (n=216), лимфома (n=127), ИП (n=90), ХМЛ (n=180), ПМФ (n=42), МДС (n=77), ОЛЛ (n=21), ОМЛ (n=59), гемофилия (n=87), тромбофилия (n=29), неопухольевые гематологические заболевания ( $\beta$ -талассемия, АА n=28), другие гематологические заболевания. Пациентов мужского пола было 569, женского – 700.

Уровень аутосенсibilизации антигенами эритроцитов оценивали в образцах крови 1259 пациентов с анемиями различного генеза: ХЛПЗ (n=317), ХМПН (n=351), ОЛ (n=80), АИГА (n=107), ПНГ (n=3), криоглобулинемия (n=36), гемофилия (n=87), системные поражения соединительной ткани (n=63), анемии неуточненной этиологии (n=215). Для выявления аутоантител использовали прямой моноспецифический и полиспецифический антиглобулиновый тест (ПАГТ).

Определение антигенов групп крови систем АВО, Rh, Келл, MNS, Даффи, Кидд, Льюис, Лютеран и антиэритроцитарных антител проводили методом центрифугирования в геле с использованием оборудования и реактивов фирмы «BIO-RAD», США.

Эффективность применения метода молекулярно-генетического типирования групп крови эритроцитов у реципиентов оценивали в образцах крови 95 пациентов, получивших 3 и более трансфузий эритроцитных

компонентов крови в течение 3 месяцев с диагнозами:  $\beta$ -талассемия (n = 4), АА (n=5), ММ (n=7), НХЛ (n=11), ХМЛ (n=16), ПМФ (n=9), МДС (n=22), ОЛ (n=21). Генотипирование Rh, Kell проводили с помощью наборов SSP-PCR RBC – FluoGene vERYfy (Inno-train Diagnostik, Германия).

Для оценки экспрессии CD38 эритроцитами и Т-клетками периферической крови и разработки протокола для скрининга и идентификации антител у больных ММ были обследованы 52 донора крови и ее компонентов (29 мужчин и 23 женщин) в возрасте 18-65 лет (медиана – 30 лет), а также образцы крови 36 больных ММ, получающих терапию моноклональными антителами анти-CD38 (даратумумаб). Анализ проводился методом проточной цитофлуориметрии.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали на персональном компьютере с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 10.0 (StatSoft, США).

### Результаты собственных исследований

#### Иммуногематологические характеристики нейтрофилов

Для оценки популяционных особенностей распределения распределения аллелей и генотипов HNA у доноров и пациентов с гематологическими заболеваниями и оценки возможного риска HNA аллоиммунизации разработана оригинальная методика аллель-специфичной ПЦР, основанная на полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. Олигонуклеотидные праймеры для типирования HNA методом АС-ПЦР были разработаны нами с помощью программ Primer 3.0 и Primer-BLAST. При подборе праймеров учитывали длину продуктов амплификации, размер праймеров, показатель Tm (температура плавления праймеров), содержание GC и специфичность праймеров интересующим участкам ДНК. Последовательности олигонуклеотидных праймеров для типирования антигенов систем HNA-1,-3,-4,-5 представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательность олигонуклеотидных праймеров для типирования HNA-1,-3,-4,-5

Антиген	Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
HNA-1a	<i>FCGR3B</i>	ССТСААТGGTACAGGGTGCTC	GCCTGGCTTGAGATGAGGTT
HNA-1b/c	<i>FCGR3B</i>	ССТСААТGGTACAGCGTGCTT	CACTGTCGTTGACTGTGGCAT
HNA-1b/d	<i>FCGR3B</i>	ССТСААТGGTACAGCGTGCTT	ACTGTCGTTGACTGTGGCAG
HNA-3a	<i>SLC44A2</i>	СТАССТCACGTACCTGAATGCT	GCAGGGCAGTCACCATCTC
HNA-3b	<i>SLC44A2</i>	СТАССТCACGTACCTGAATGCT	GCAGGGCAGTCACCATCTT
HNA-4a	<i>ITGAM</i>	СТСАТGCGAGCCCATCCG	ACAAGGAGGTCTGACGGTGA
HNA-4b	<i>ITGAM</i>	СТСАТGCGAGCCCATCCA	ACAAGGAGGTCTGACGGTGA
HNA-5a	<i>ITGAL</i>	АТСАТCCCCACAGATCCAG	AGCTGGACCCAGTAAGCATC
HNA-5b	<i>ITGAL</i>	АТСАТCCCCACAGATCCAC	AGCTGGACCCAGTAAGCATC

Примечание: нуклеотиды, комплементарные SNP, определяющим наличие антигена, выделены жирным шрифтом.

Для анализа специфичности праймеров использовали образцы ДНК 20 доноров, последовательности аллелей HNA-1, 3-5 которых были определены методом секвенирования (исследования проводились коммерческой компанией «Бигль»), а также образцы ДНК 100 доноров, последовательности аллелей HNA-1, 3-5 которых были определены с применением коммерческой тест-системы «HNA-FluoGene» (Inno-train, Германия). Детекцию результатов проводили методом электрофореза в 2% агарозном геле, а также в режиме реального времени – по регистрируемому в процессе амплификации нарастанию сигнала от флуорофора EVAGreen, после чего проводили сравнение полученных результатов.

По результатам электрофоретического разделения неспецифические продукты ПЦР выявлены не были. Сходимость результатов, полученных методом секвенирования, гель-электрофореза («HNA-FluoGene») и АС-ПЦР с оригинальными олигонуклеотидными праймерами и детекцией результатов в режиме реального времени составила 1,0.

Для определения аналитической чувствительности ПЦР было проведено тестирование ДНК-образца, имеющего генотип HNA-1a/bc/bd,-3a/b,-4a/b,-5a/b, с общим количеством ДНК в реакции от 50 нг до 0,1 нг. Результат считали положительным, если экспоненциальная стадия нарастания флуоресцентного сигнала приходилась на 20-30 циклы. Минимальное необходимое количество ДНК составило 3,125 нг в реакцию.

Условия проведения ПЦР в реальном времени для аллелей HNA-1,3-5 были одинаковыми.

Результаты оценивали на амплификаторе CFX96TM Real-Time System (Bio-Rad, США) в режиме реального времени по регистрируемому в процессе амплификации нарастанию сигнала от флуорофора EVAGreen. Все сигналы имели характерную S-образную форму с пороговым циклом от 20 до 30.

Таким образом, разработана методика HNA-типирования методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции, характеризующаяся высокой аналитической чувствительностью и специфичностью (1,0) и позволяющая оценить риск аллоиммунизации. Методика верифицирована на выборке из 100 образцов ДНК.

С помощью разработанной методики проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов HNA у доноров крови и ее компонентов Северо-Западного региона РФ и пациентов с гематологическими заболеваниями, получавших терапию в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России. Результаты исследования генотипов HNA у доноров и пациентов приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнение частот встречаемости генотипов HNA у доноров и пациентов с гематологическими заболеваниями

Система	Генотип	Частота встречаемости у пациентов, n (%)	Частота встречаемости у доноров, n (%)	$\chi^2$
HNA-1	<i>a/a</i>	54 (14,4)	56 (14,0)	$\chi^2= 4,606$ $p>0,05$
	<i>a/bc/bd</i>	8 (2,1)	14 (3,5)	
	<i>a/bc</i>	15 (4,0)	8 (2,0)	
	<i>a/bd</i>	155 (41,3)	177 (44,25)	
	<i>bc/bd</i>	3 (0,8)	4 (1,0)	
	<i>bd/bd</i>	140 (37,3)	141 (35,25)	
HNA-3	<i>a/a</i>	237 (63,2)	259 (64,75)	$\chi^2=0,674$ $p=0,71$
	<i>a/b</i>	124 (33,1)	123 (30,75)	
	<i>b/b</i>	14 (3,7)	18 (4,5)	
HNA-4	<i>a/a</i>	292 (77,9)	321 (80,25)	$\chi^2= 0,77$ $p=0,68$
	<i>a/b</i>	79 (21,1)	76 (19,0)	
	<i>b/b</i>	4 (1,1)	3 (0,75)	
HNA-5	<i>a/a</i>	191 (50,9)	196 (49,0)	$\chi^2= 4,06$ $p=0,13$
	<i>a/b</i>	145 (38,7)	176 (44,0)	
	<i>b/b</i>	39 (10,4)	28 (7,0)	

Частоты встречаемости генотипов HNA-1,-3,-4,-5 у пациентов с гематологическими заболеваниями не имели статистически значимых различий от таковых у доноров Северо-Западного региона РФ. В обследуемых нами группах частота встречаемости аллеля HNA-1bd была выше (0,584-0,588), чем HNA-1a (0,376-0,384). Частота встречаемости HNA-1bc составляла 0,032-0,036. Редкие генотипы HNA-1bc/bc и HNA-1null выявлены не были. Аллель «а» систем HNA-3,-4,-5 встречался у большинства исследуемых в каждой группе (0,795-0,804; 0,887-0,898; 0,699-0,708). Генотип HNA-3bb, ассоциируемый с высоким риском развития TRALI, определен у 3,7% и 4,5% реципиентов и доноров крови, соответственно.

Типирование HNA-2a (CD177) проводили методом проточной цитофлуориметрии. Частоты встречаемости фенотипов HNA-2a ( CD177) в обеих группах не имели статистически значимых различий. Частота встречаемости HNA-2null составила 4,9% у доноров и 5,3% у пациентов с гематологическими заболеваниями.

Экспрессия CD177 гетерогенна и может быть би-, три- или тетрамодалными. Уровень экспрессии оценивали по показателю средней интенсивности флуоресценции (СИФ). Значение СИФ в группе доноров принимали за референтную величину. Уровень экспрессии CD177 СИФ в исследуемых группах представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Уровень экспрессии CD177 нейтрофилами доноров и пациентов с гематологическими заболеваниями

Показатель		Группа 1 (n=303)	Группа 2 (n=147)	Группа 3 (n=155)	p
СИФ CD177	(M±m)	85,7±8,63	140,59±19,65	124,01±10,36	<b>p<sub>1-2</sub>=0,005</b>
	Me;	79,2;	131;	114;	<b>p<sub>1-3</sub>=0,01</b>
	ДИ	41,2-136,4	43,9-384,36	40,9-356,7	p <sub>2-3</sub> =0,19

*Примечание:*

*Группа 1 – доноры крови и ее компонентов; Группа 2 – пациенты с ХЛПЗ;*

*Группа 3 – пациенты с МПН.*

*Различия достоверны согласно t-критерия Стьюдента ( $p \leq 0,05$ ).*

Уровень экспрессии CD177 нейтрофилами в группах пациентов с ХЛПЗ и МПН не различался, но был достоверно выше, чем в группе доноров ( $p=0,005$  и  $p=0,01$ , соответственно). Повышение уровня экспрессии у пациентов с ХЛПЗ связано с тем, что нейтрофилы у пациентов с ХЛПЗ имеют активированный фенотип, вероятно, связанный с системным воспалением. Наличие хронической системной воспалительной реакции также может объяснить увеличение экспрессии CD177 у пациентов с МПН.

Оценка уровня экспрессии CD177 у гематологических больных может быть дополнительным маркером оценки состояния больного.

На основании частот встречаемости аллелей и генотипов оценен риск аллоиммунизации при рандомных трансфузиях. Установлено, что наибольшая величина расчётного риска аллоиммунизации отмечена при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b и составляла 0,250, 0,233, 0,231, соответственно. Однако расчетный риск аллоиммунизации может отличаться от истинного уровня.

Для оценки истинного уровня аллоиммунизации у доноров и реципиентов крови и ее компонентов к антигенам нейтрофилов разработана методика выявления антител к антигенам нейтрофильных гранулоцитов (HNA-1a/1bc/bd, HNA-2a, HNA-3a/3b, HNA-4a/4b HNA-5a/5b) методом проточной цитофлуориметрии. Разработка методики включала следующие этапы: получение клеточной суспензии (лейкоцитов); настройка протокола; пробоподготовка и детекция результатов. Для настройки протокола использовали как ручные, так и автоматические режимы с использованием приложений программного обеспечения Navios™. Для выделения популяций лейкоцитов использовали антитела против молекул CD45, CD16 и CD19. В качестве вторичных антител использовали анти-IgG и -IgM. Для дифференцировки антител к антигенам нейтрофилов и антител IgG, входящих в состав иммунных комплексов и связанных с Fc рецептором, в методику было включено использование Fc блокатора, представляющего собой Fc фрагмент IgG, «вытесняющий» IgG с сайта связывания Fc рецептора.

В качестве отрицательного контроля использовали лейкоциты донора, инкубированные с аутосывороткой, и контрольной сывороткой группы крови АВ. В качестве положительного контроля использовали лейкоциты донора,



инкубированные с поливалентной контрольной сывороткой, содержащей анти-HNA/HLA аллоантитела (набор сывороток антилейкоцитарных HLA-A, B, C, DR гистотипирующих жидких (HLA) «HLA-сыворотки» и «Положительный контроль для лимфоцитотоксического теста» (АО МЦИиГР «ГИСАНС», Санкт-Петербург).

Таким образом, разработанный метод позволяет выявлять ауто- и аллоантитела классов G и M, а также проводить исследование с использованием небольшого числа клеток. Применение метода не требует изоляции нейтрофилов на этапе пробоподготовки и позволяет выделить популяцию нейтрофилов в процессе анализа. Данный метод может быть использован для оценки связывания антител с моноцитами и лимфоцитами, что позволяет проводить дифференциацию между нейтрофильными антителами и антителами к другим популяциям лейкоцитов.

Установлено, что уровень HNA-аллоиммунизации у доноров составляет 0,35%. В группе доноров мужского пола аллоантитела к HNA выявлены не были. Все сенсibilизированные доноры были лицами женского пола в возрасте 30-60 лет. Частота встречаемости антител к HNA среди доноров-женщин составила 0,81%. Выявленные антитела имели специфичность анти-HNA-1a, анти-HNA-3b и анти-HNA-4b и принадлежали к Ig класса G. Антитела к антигену HNA-3a, ассоциированные с высоким риском развития TRALI выявлены не были.

Частота выявления аллоантител к антигенам HNA у пациентов с гематологическими заболеваниями достоверно выше, чем у доноров (3,17% против 0,35%,  $p < 0,001$ ). Аллоиммунизированные пациенты достоверно чаще встречались среди женщин, чем среди мужчин (2,4% против 0,8%,  $p \leq 0,05$ ). Частота встречаемости аллоантител в зависимости от заболевания представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Частота выявления анти-HNA антител пациентов в зависимости от заболевания

Нозология	Всего больных, n	Количество аллоиммунизированных больных	
		n	%
АА	12	2	16,7
ММ	131	0	0
ОЛ	55	2	3,6
Лимфомы	55	1	1,8
ПМФ	21	1	4,8
МДС	43	2	4,6
ХМЛ	33	1	3,03
Гемофилия	28	3	10,7
Всего	378	12	3,17

Максимальный уровень аллоиммунизации - 16,7% и 10,7% - был установлен у пациентов с АА и гемофилией, соответственно. У пациентов с гемобластомами анти-ННА аллоантитела выявляли с меньшей частотой - от 1,8% до 4,6%. Наличие аллоантител к ННА связано, вероятно, с трансфузиями нефилтрованных компонентов крови, а также с предшествующими беременностями у женщин.

Значительное снижение риска развития аллоиммунизации к ННА после трансфузий достигается путем внедрения в практику методов лейкоредукции компонентов крови, а также применения тромбоцитсодержащих компонентов крови, заготовленных с использованием ресуспендирующих растворов. Полученные данные свидетельствуют о необходимости контроля за соблюдением мер по профилактике аллоиммунизации на всех этапах оказания медицинской помощи.

Нейтропения является важным критерием при заболеваниях. Для решения вопроса о вовлечении иммунных механизмов в развитие нейтропении необходимо определение аутоантител. В нашем исследовании аутоантитела были выявлены только у пациентов с ХЛПЗ. Поэтому в дальнейший анализ были включены только пациенты с ХЛПЗ. Частота выявления аутоантител составила 3,4%. Выявляемость аутоантител к антигенам нейтрофилов в зависимости от заболевания представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Частота выявления аутоантител к антигенам нейтрофилов у пациентов в зависимости от заболевания

Нозология	Всего больных, n	Количество аутосенсibilизированных больных	
		n	%
ММ	201	5	2,5
ХЛЛ	69	3	4,3
ВКЛ	10	2	20,0
ЛХ	11	1	9,1
НХЛ	65	1	1,5

В нашем исследовании аутоантитела к нейтрофилам чаще встречались у пациентов с ВКЛ и ЛХ, что связано с патогенезом нозологий. Необходимо отметить, что ВКЛ является редким заболеванием и соответственно группа представлена только 10 больными.

Таким образом, исследование наличия аутоантител к антигенам систем ННА у пациентов с ХЛПЗ в динамике целесообразно для коррекции нейтропении, а также улучшения результатов лечения (снижение инфекционных осложнений, соблюдение режимов лечения).

У взрослых пациентов с впервые выявленной нейтропенией частота встречаемости аутоантител составила 0,9%, у детей – 14,4%. Аутосенсibilизация чаще наблюдалась у детей в возрастной группе до 1 года (65,9%). В возрастной группе 1 год - 5 лет наблюдалась тенденция к снижению аутосенсibilизации (21,7%). Нами получен высокий процент выявления

аутоантител в возрастной группе 5-18 лет (12,9%). Возможно, в дальнейшем при проведении комплекса обследований для уточнения генеза нейтропении у таких пациентов будут выявлены нозологии, при которых возможен сбой аутоотолерантности.

Однако у новорожденных нейтропения может быть не только аутоиммунной, но и аллоиммунной, изоиммунной или возникать в результате воздействия неиммунных этиологических факторов. Для установления иммунной природы нейтропении разработан алгоритм диагностики аллоиммунной нейтропении. Алгоритм диагностики иммунной нейтропении представлен на рисунке 1.

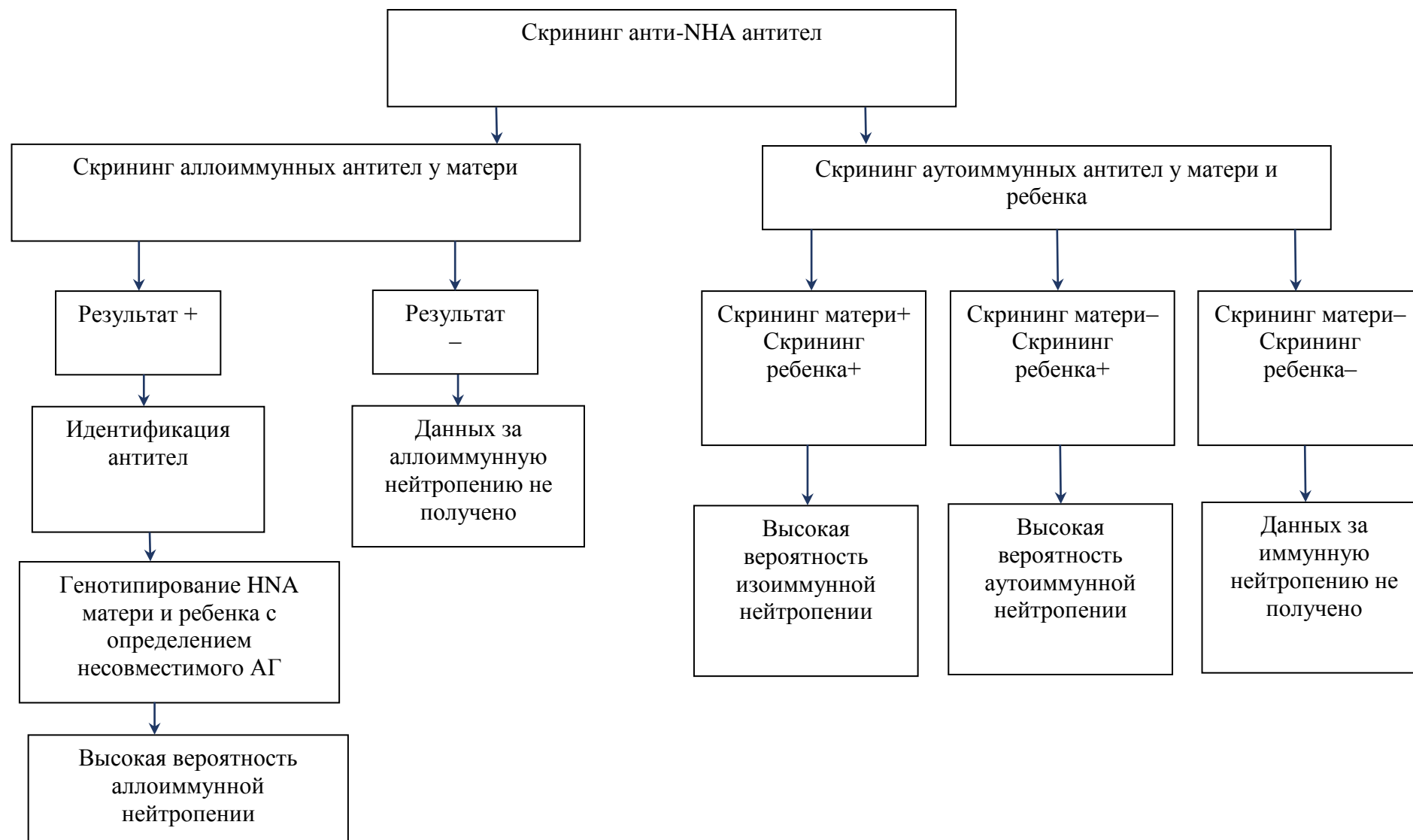


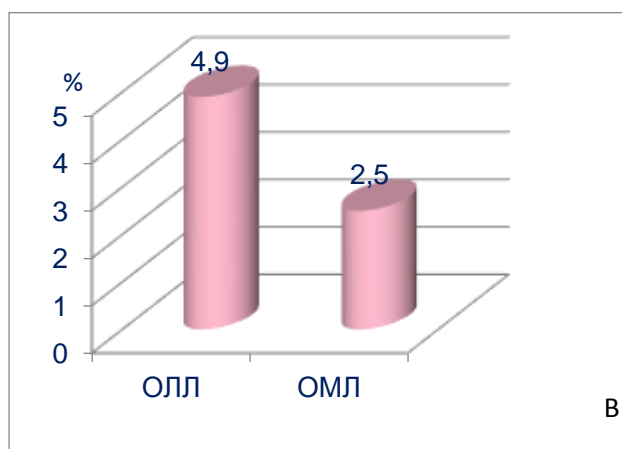
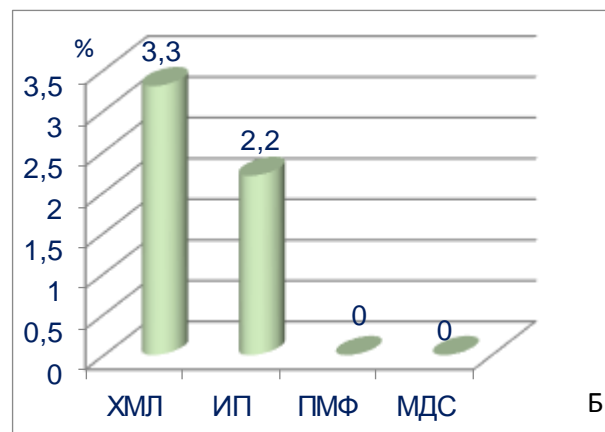
Рисунок 1 – Алгоритм диагностики иммунной нейтропении

Разработанный алгоритм, в основе которого лежит выявление антител и установления связи между генотипом HNA пар «ребенок-мать», отражает универсальный механизм разрушения клеток крови вследствие аллоиммунного конфликта. Данный алгоритм может быть использован для диагностики иммунной нейтропении не только у детей, но и для расследования посттрансфузионных осложнений, связанных с HNA.

### **Иммуногематологические характеристики эритроцитов**

Особенностью деятельности иммуногематологических лабораторий является получение не количественных, а точных качественных характеристик. Правильность интерпретации результатов иммуногематологических исследований является важным критерием профилактики обусловленного трансфузией гемолиза.

Установлено, что сложность интерпретации результатов типирования групп крови эритроцитов по системам ABO и Rh у пациентов с гематологическими заболеваниями обусловлена снижением концентрации анти-A и/или анти-B антител (13,2%), снижением экспрессии антигенов систем ABO и Rh (1,9%), наличие химеризма (9,9%) и панаггютинации (1,4%). Изменения результатов определения анти-A и анти-B антител значительно чаще встречается у пациентов с ХЛПЗ, чем у больных с МПН (85,71% и 8,04%, соответственно), что связано с патогенезом заболеваний. В группе ХЛПЗ снижение силы реакции чаще наблюдалось у больных ММ и ХЛЛ и статистически значимо реже у больных лимфомами ( $p < 0,05$ ). В группе МПН снижение силы реакции с одинаковой частотой встречалось у больных ХМЛ и ИП и не встречалось у больных МДС и ПМФ. В группе больных ОЛ частота встречаемости снижения силы реакции агглютинации у больных ОМЛ и ОЛЛ не имела статистически значимых различий (рис. 2).



Примечание: \*  $p \leq 0,05$  различия в группе заболеваний; \*\*  $p \leq 0,05$  различия между группами. А – ЛПЗ; Б – МПН; В – ОЛ. % от числа пациентов с одним и тем же заболеванием. Рисунок 2 – Частота снижения силы реакции агглютинации тест-эритроцитов анти-А и/или анти-В антителами пациентов в зависимости от нозологической формы

При исследовании антигенов систем АВО и Rh снижение экспрессии или ее полное отсутствие наблюдалось у 22 уже ранее наблюдававшихся пациентов с ОМЛ, ХМЛ, МДС и ИП. Сила реакции агглютинации варьировала от слабой реакции (1+) до ее полного отсутствия. Встречаемость изменения силы реакции агглютинации при исследовании антигенов систем АВО и Rh у пациентов с гематологическими заболеваниями представлена в таблице 6.

Таблица 6 – Изменение силы реакции агглютинации при исследовании антигенов систем АВО и Rh у пациентов с гематологическими заболеваниями

Диагноз	Количество пациентов с изменением экспрессии АГ, n	Потеря экспрессии антигена А или В, n	Снижение экспрессии антигена А или В, n	Потеря экспрессии антигена D или С, n	Снижение экспрессии антигена D или С, n
ОМЛ (n=59)	9 (15,2%)*	3 (5,1%)	5 (8,5%)	-	1 (1,7%)
ХМЛ (n=180)	8 (4,4%)*	-	6 (3,3%)	2 (1,1%)	-
МДС (n=77)	3 (3,9%)*	-	2 (2,6%)	-	1 (1,3%)
ИП (n=90)	2 (2,2%)*	-	1 (1,1%)	-	1 (1,1%)
Всего	22	3	14	2	3

Примечание: % от числа пациентов с одним и тем же заболеванием

У 17 из 22 пациентов – наблюдалось снижение экспрессии антигенов эритроцитов (сила реакции агглютинации 1+). У 5 пациентов зафиксировано полное отсутствие агглютинации, свидетельствующее о потере экспрессии этих антигенов эритроцитами.

В нашем исследовании изменение экспрессии антигенов систем АВО и Rh встречалось только у больных с миелоидными расстройствами. Причем в период ремиссии экспрессия антигенов восстанавливалась у всех, за исключением 3 пациентов с ОМЛ. Последние характеризовались отсутствием цитогенетической ремиссии, неблагоприятным течением заболевания и летальным исходом.

Наличие двойных популяций эритроцитов при определении антигенов системы Rh за период наблюдения обнаружено у 14 больных, что составило 9,9% всех обследованных пациентов гематологической клиники. Наиболее часто двойные популяции эритроцитов выявлялись у пациентов с МДС (45,61%), АА (27,27%), ПМФ (22,73%), ОЛ (22,2%) и их наличие было связано с предшествующими трансфузиями компонентов крови. В таких случаях точно установить фенотип эритроцитов невозможно. Одним из путей решения данной проблемы является применение генотипирования.

Исследование по оценке эффективности применения молекулярно-генетического типирования групп крови эритроцитов RhCE и Kell показало, что среди доноров крови и ее компонентов результаты совпадали на 100% (20/20), в то время как в исследуемых образцах крови, ранее наблюдавшихся в учреждении пациентов, расхождение составило 45,3%. Расхождение результатов типирования антигенов систем Rh и Kell серологическим и молекулярно-генетическим методом представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Расхождения результатов серологического и молекулярно-генетического типирования групп крови RhCE и Kell у пациентов

Система антигенов	Антиген, по которому выявлено расхождение	Число больных с расхождением по антигенам, n (%)**	Фенотип, (n)	Генотип, (n)
Rh	C	11 (11,5)	Cx*cEe (7)	ccEe (7)
			Cx*cеe (1)	ccee (1)
			Cx*cEE (3)	ccEE (3)
	E	9 (9,5)	CcEx*e (5)	Ccee (5)
			CCEx*e (4)	CCee (4)
	c	9 (9,5)	Ccx*ee (4)	CCee (4)
			Ccx*Ee (5)	CCЕe (5)
	cE	4 (4,2)	Ccx*Ex*e (4)	CCee (4)
	e	3 (3,2)	CcEex* (1)	CcEE (1)
			ccEex* (2)	ccEE (2)
	Ce	2 (2,1)	Cx*cEex* (2)	ccEE (2)
	CE	1 (1,1)	Cx*cEx*e (1)	ccee (1)
DC	2 (2,1)	ccdee (2)	CcDee (2)	
Kell	K	2 (2,1)	CcEeK- (2)	CcEeK+ (2)

Примечание: \*x - «химера» - двойная популяция эритроцитов; \*\*% от числа пациентов с трансфузионным химеризмом.

39 пациентов показали наличие антигенов C, c, E, e в фенотипе и отсутствие в генотипе, что свидетельствует о трансфузиях гемокомпонентов, совместимых в НАГТ, но не идентичных по антигенам системы Rh. Обращает на себя внимание высокий процент несоответствия по антигену c, который обладает высокой иммуногенностью. Десять пациентов, фенотип которых определялся как RhCc, имели генотип как *RHCE\*CC*, что приводило к необходимости поиска c-отрицательных единиц эритроцитов. У таких пациентов высока вероятность аллоиммунизации. Аналогично, два пациента, которые были фенотипированы как Rhee, имели генотип *RHCE\*EE*, что требовало поиска e-отрицательных единиц эритроцитов. У 2 человек антигены D и C не определялись в фенотипе, но определились в генотипе. Отсутствие в фенотипе указанных антигенов свидетельствовало о потере экспрессии антигенов эритроцитами. Расхождения по антигену K зафиксировано у двух пациентов, причем антиген отсутствовал в фенотипе, но присутствовал в генотипе. Полученные расхождения связаны трансфузиями эритроцитной взвеси фильтрованной, не содержащей антиген K системы Kell.

Еще одной проблемой при определении группы крови АВО является наличие панагглютинирующих антител. Для устранения панагглютинации сыворотку инкубировали при t+56°C в течение 30 мин на водяной бане, а эритроциты пациента трижды отмывали физиологическим раствором, прогретым до t+37°C. В результате инкубации сыворотки пациентов до t 56°C



перекрестно-реагирующие антитела и компоненты комплементы, связавшиеся с рецепторами эритроцитов, были инактивированы. Пациенты получали трансфузии компонентов крови с учетом определенной таким образом группы крови. В результате трансфузий эритроцитной взвеси посттрансфузионных реакций и осложнений зафиксировано не было.

Скрининг антиэритроцитарных антител является обязательным исследованием. Установлено, что интерпретация результатов скрининга была затруднена в 6,55% случаев и связана с наличием аутоантител (0,6%) и перекрестно-реагирующих антител (5,9%).

Антиэритроцитарные аллоантитела были выявлены в 2,05% случаев. Среди аллоиммунизированных резус-положительную принадлежность имели 14 (53,8% от числа иммунизированных больных) иммунизированных больных, резус-отрицательную – 12 (46,15%) иммунизированных больных. Среди аллоиммунизированных больных было 10 мужчин (0,8% от общего количества пациентов) и 16 женщин (1,3%). Выявленные антиэритроцитарные антитела были представлены иммуноглобулинами классов М (0,4% случаев от общего числа больных) и G (1,65% случаев от общего числа больных). Антитела к антигенам системы Rh были выявлены в 68,2 % случаев, а к антигенам других систем эритроцитов – в 31,8% случаев. В структуре выявленных антител класса IgG преобладали анти-D антитела (31,9%) и анти-K антитела (27,3%) (табл. 8).

Таблица 8 – Специфичность выявленных антиэритроцитарных антител класса IgG

Число аллоиммунизированных пациентов, n	Число пациентов с различными специфичностями аллоантител класса IgG, n					
	анти-D	анти-DC	анти-E	анти-Cw	анти-K	анти-Fya
22	7 (31,9%)	5 (22,7%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)	6 (27,3%)	1 (4,5%)

Антитела класса IgM специфичностей анти-c, анти-E выявлялись с одинаковой частотой и составили по 7,7% соответственно, анти-E+K+Кра выявлялись в 3,8% случаев от числа аллоиммунизированных больных. Данные антитела выявлялись не при каждой госпитализации. Причинами появления таких антител могли быть контакты с группоспецифичными субстанциями растительного, животного и бактериального происхождения, а также мутации генов, контролирующих синтез иммуноглобулинов [Донсков С.И., 2011].

Антитела выявлялись как у женщин, так и у мужчин (табл.9).

Таблица 9 – Выявляемость антиэритроцитарных антител в зависимости от пола и Rh–принадлежности

Специфичность антител	Пациенты с выявленными антителами				
	всего	Rh(-)принадлежность		Rh(+)принадлежность	
		женщины	мужчины	женщины	мужчины
анти-D	7	3(2**; 1*)	4*	-	-
анти-DC	5	4(3**;1*)	1*	-	-
анти-E	2	-	-	2**	-
анти-C <sup>w</sup>	1	-	-	1*	-
анти-K	6	-	-	3**	3*
анти-Fya	1	-	-	1**	-
Всего	22	7(31,9%)	5(22,7%)	7(31,9%)	3(13,6%)

Примечание: \*- пациенты с трансфузиями в анамнезе; \*\* - пациенты с беременностями и трансфузиями в анамнезе

В анамнезе аллоиммунизированных женщин были и трансфузии, и беременности, у мужчин – трансфузии. У Rh-отрицательных пациентов были выявлены только анти-D или анти-DC антитела, что подтверждает высокую иммуногенность данных антигенов. У Rh-положительных чаще выявляли анти-K антитела как у мужчин, так и у женщин и составили по 30% соответственно от числа Rh-положительных аллоиммунизированных пациентов. Антитела к антигенам системы Duffy встречаются редко и в нашем исследовании были выявлены у 4,5% иммунизированных лиц. Несовместимые по данному антигену трансфузии всегда приводят к развитию ПТО. Антител к антигенам систем эритроцитов MNS, Kidd, Lewis, Lutheran нами выявлено не было. На основании частоты выявления аллоантител трансфузионно опасные антигены распределились следующим образом: D > K > DC > E, c > CW, Fya.

Выявляемость аллоантител в зависимости от заболевания представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Выявление антиэритроцитарных антител в зависимости от заболевания

Заболевание	Пациенты с аллоантителами	
	n	% от числа больных с заболеванием
ОМЛ (n=59)	1*	1,7
ХЛЛ (n=216)	2**	0,9
Лимфома (n=127)	3(2*; 1**)	2,4
МДС (n=77)	1*; ***	1,3
ММ (n=291)	1**	0,3
Неопухолевые гематологические заболевания (АА, β-талассемия(n=28))	4(2**; 2***)	14,3
Тромбофилия (n=29)	2 **	6,9
Гемофилия (n=87)	8***	9,2

Примечание: \*- пациенты с отягощенным акушерским анамнезом (дети с ГБН); \*\* - пациенты с беременностями и трансфузиями в анамнезе; \*\*\* - пациенты с трансфузиями в анамнезе

Наиболее высокий процент выявления антител зафиксирован в группе пациентов с неопухолевыми гематологическими заболеваниями (β-Талассемией, АА), гемофилией и тромбофилией (от 6,9 до 14,3%). У пациентов с гемобластозами антитела выявлялись с частотой от 0,3 до 2,4%. Так, в группе пациентов с β-Талассемией и АА антитела выявляли достоверно чаще, чем у пациентов с ОМЛ (p=0,024), ХЛЛ (p=0,0001), лимфомой (p=0,023), МДС (p=0,009), ММ (p=0,0001); у пациентов с тромбофилией антитела выявляли чаще, чем у пациентов с ХЛЛ (p=0,018) и ММ (p=0,0001). У пациентов с гемофилией антитела выявляли чаще, чем у пациентов с ХЛЛ (p=0,0001), лимфомой (p=0,027), МДС (p=0,027), ММ (p=0,0001).

Серьезной проблемой при интерпретации результатов скрининга аллоантител является наличие неспецифических перекрестно-реагирующих антител. Неспецифические перекрестно-реагирующие антитела достоверно чаще выявляли в сыворотке у пациентов с ММ (19,2%), чем у пациентов с ХЛЛ (6%; p=0,0001), МДС (5,2%; p=0,004) и ОЛ (2,5%; p=0,003). Выявленные антитела принадлежали к иммуноглобулинам классов М и G (табл.11).

Таблица 11 – Выявление перекрестно-реагирующих антител при различных заболеваниях

Заболевание	Антитела класса Ig M		Антитела класса Ig G	
	n	% от числа больных с перекрестно-реагирующими антителами	n	% от числа больных с перекрестно-реагирующими антителами
ММ	10	17,86	46	82,14
ХЛЛ	13	100	-	0
МДС	4	100	-	0
ОЛ	2	100	-	0
Всего	29		46	

Наличие у пациента аутоантител затрудняют постановку предтрансфузионных тестов на совместимость, так как аутоантитела могут маскировать одновременно присутствующие аллоантитела. Так, положительный результат в полиспецифическом ПАГТ были получены у 257 пациентов, что составило 20,4%. В образцах крови пациентов с позитивным результатом ПАГТ были выявлены моноспецифичные IgG антитела, компоненты комплемента С3, а также сочетания антител различных классов иммуноглобулинов с компонентом комплемента: IgG +С3; IgG +IgM+С3; IgM+С3 и IgG +IgA. Распределение выявленных аутоантител к классам иммуноглобулинов и С3 в зависимости от нозологии представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Распределение выявленных аутоантител к классам иммуноглобулинов и С3 при различных заболеваниях

Заболевание	С3, n (%)	IgG, n (%)	IgG +С3, n (%)	IgG+ IgM+С3, n (%)	IgM+С3, n (%)	IgA, n (%)
ХЛПЗ	1(1,3)	27(35,1)	24(31,1)	15(19,5)	10(13)	
ХМПН	4(17,4)	18(78,3)		1(4,3)		
ОЛ		1(50)	1(50)			
АИГА	12(14,1)	30(35,3)	27(31,8)	6(7)	8(9,4)	2(2,3)
ПНГ	3(100)					
Криоглобулинемия	10(62,5)				6(37,5)	
Анемии неуточненной этиологии	3(8,3)	21(58,3)	6(16,7)	3(8,3)	3(8,3)	
Гемофилия	1(33,3)	1(33,3)	1(33,3)			
Системные поражения соединительной ткани	1(8,3)	5(41,7)	3(25)		3(25)	

Примечание - % от числа пациентов с аутореактивными антителами в группе заболеваний

На основании проведенных исследований разработаны алгоритмы исследований, позволяющие определить группу крови по системам АВО и Rh в сложных случаях, дифференцировать перекрестно-реагирующие антитела, не

имеющие клинического значения, и ауто- и/или аллоантитела, имеющие клиническое значение, а также идентифицировать специфичность аллоантител у пациентов с аутоантителами.

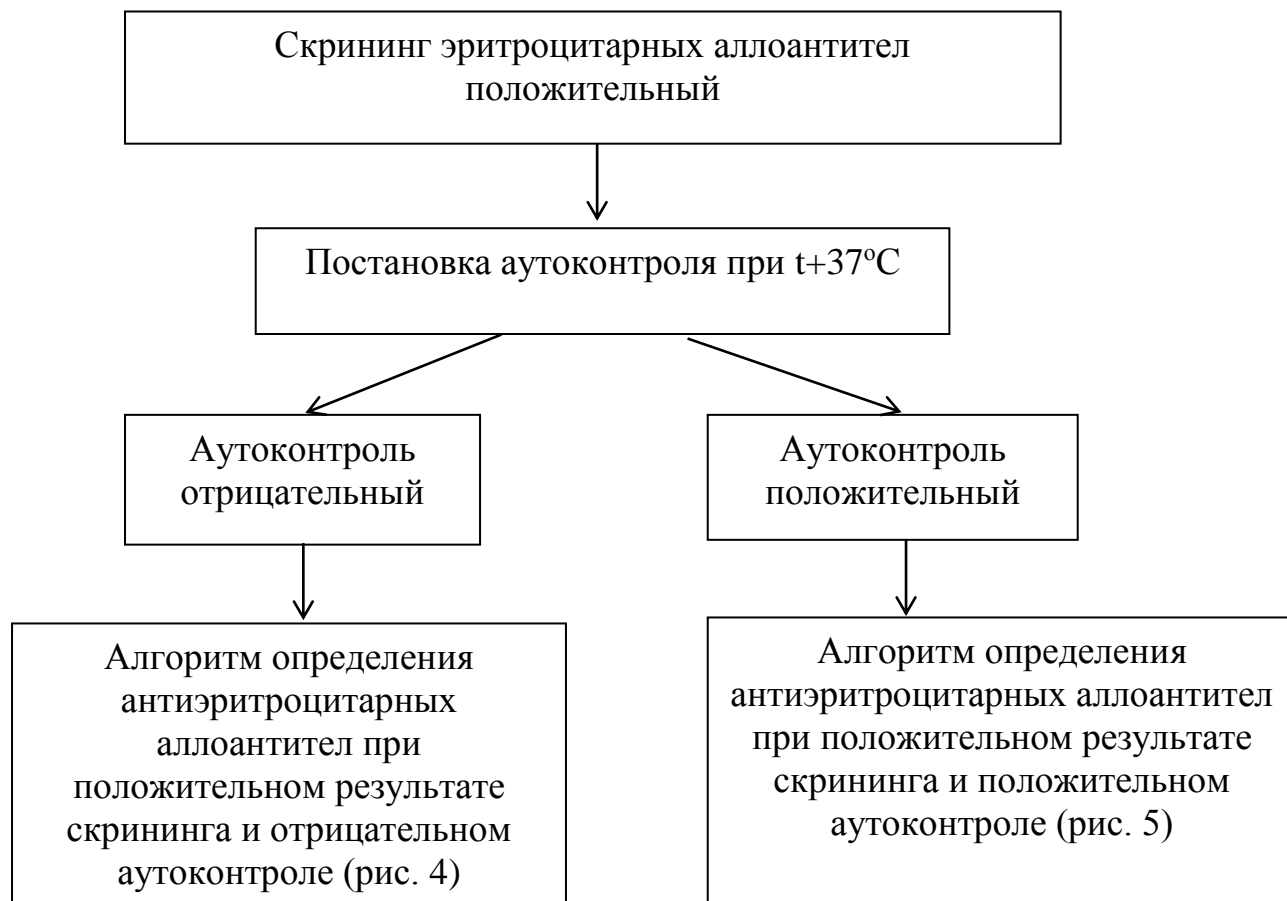


Рисунок 3 – Алгоритм определения антиэритроцитарных аллоантител в сложных случаях

Алгоритмы определения эритроцитарных аллоантител при положительном и отрицательном результатах аутоконтроля представлены на рисунках 4 и 5.

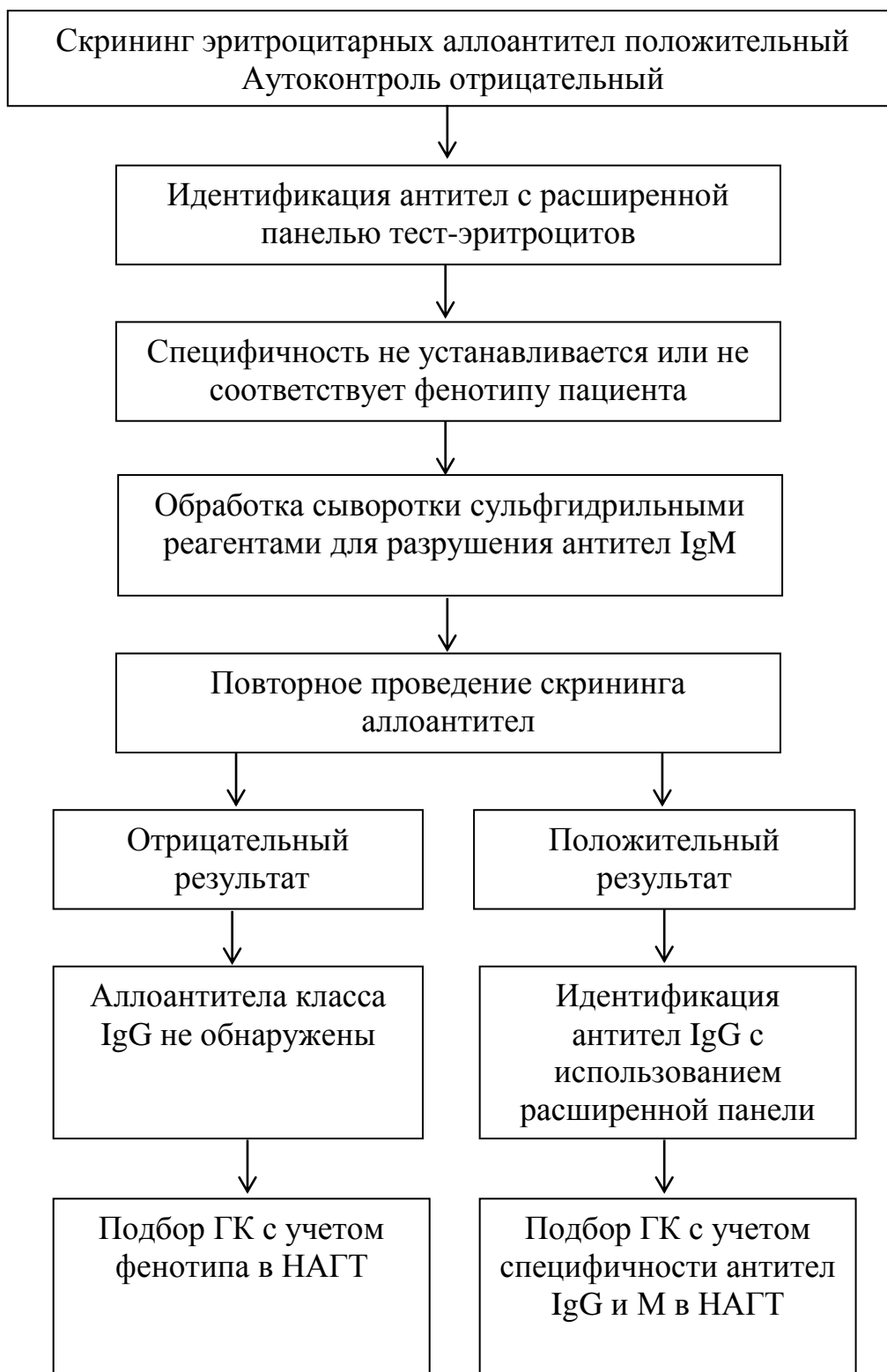


Рисунок 4 – Алгоритм определения антиэритроцитарных аллоантител при положительном результате скрининга и отрицательном аутоконтроле

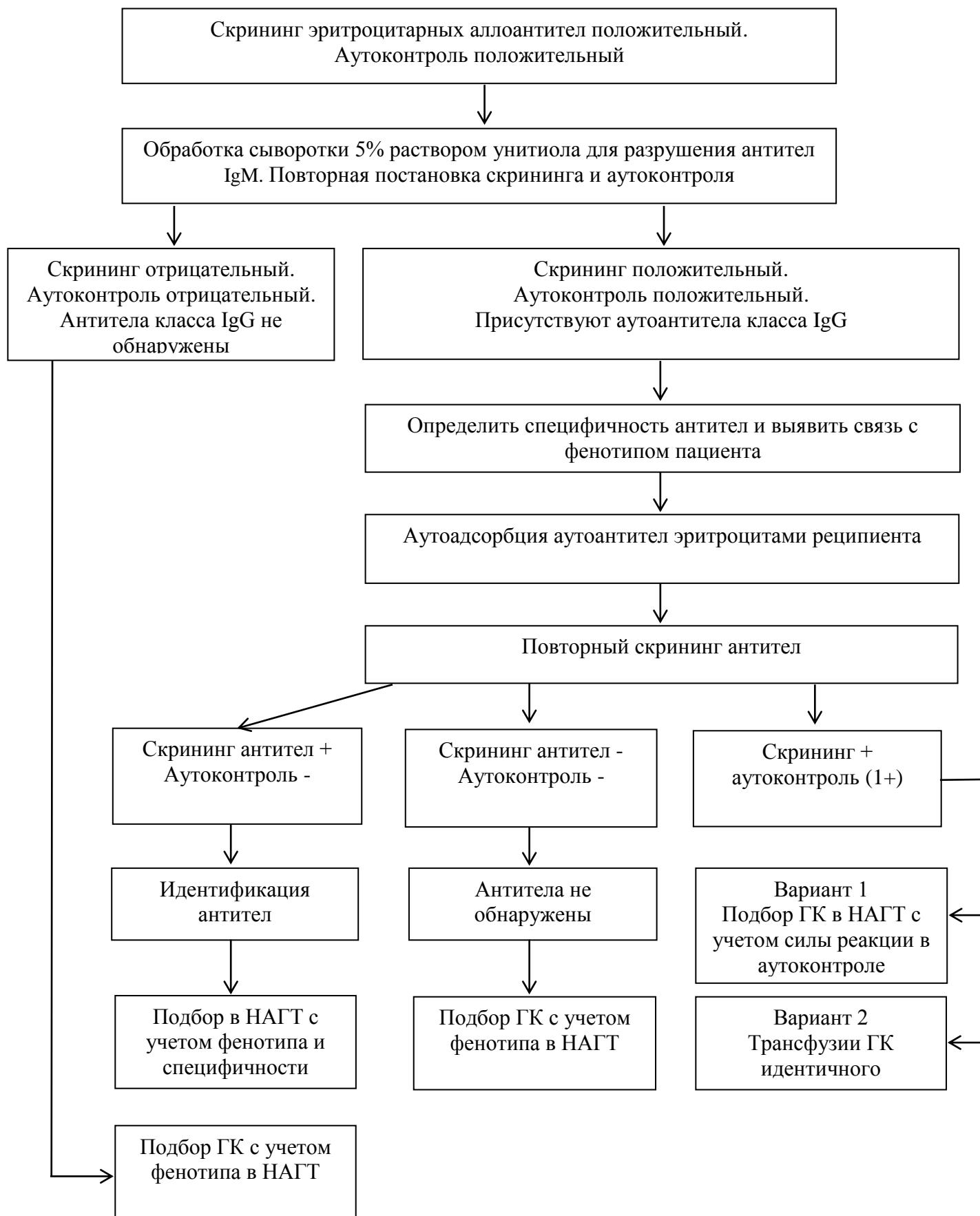


Рисунок 5 – Алгоритм определения антиэритроцитарных аллоантител при положительном результате скрининга и положительном аутоконтроле

Использование предлагаемых алгоритмов позволило осуществить реципиентам с перекрестно-реагирующими и аутоантителами подбор совместимых эритроцитных компонентов с эффективностью более 96% (табл.13).

Таблица 13 – Анализ эффективности индивидуального подбора

Причина индивидуального подбора	Общее количество подборов	Количество эффективных подборов
Наличие у пациента перекрестно-реагирующих антител, n=41	606	577 (95,2%)
Наличие аутоантител у пациента, n=4	12	12 (100%)
Пациенты, нуждающиеся в частых трансфузиях, n=21	109	109 (100%)

Для пациентов с аллоантителами к антигенам эритроцитов (n=9) была определена специфичность аллоантител и проведено 201 исследование на совместимость. 118 доз гемокомпонентов были совместимы с сыворотками реципиентов, а 83 образца донорской крови оказались несовместимы из-за наличия антигена, к которому у пациентов были антитела. Эффективность подбора зависела от частоты встречаемости антигена и фенотипа АВО.

Терапия лекарственными антителами анти-CD38 существенно осложняла интерпретацию скрининга антиэритроцитарных антител у пациентов с ММ. В связи с этим возникла необходимость оценки экспрессии CD38 эритроцитами. Экспрессия CD38 на эритроцитах доноров не выявлена (табл. 14).

Таблица 14 – Оценка экспрессии CD38 эритроцитами у доноров, n=52

Показатель	Значения (M±m)	p
СИФ Isotype IgG1 (контроль)	19,47±0,65	p= 0,46
СИФ CD38 в образцах донорских эритроцитов	19,90±0,41	

Примечание: Разница достоверности в контрольной и опытной группах указана согласно t-критерия Стьюдента

Однако при проведении скрининга антиэритроцитарных аллоантител в НАГТ у таких пациентов мы наблюдали агглютинацию разной силы реакции с образцами тест-эритроцитов. После серии отмываний физиологическим раствором (NaCl) тест-эритроцитов и повторного типирования CD38 на эритроцитах методом проточной цитофлуориметрии мы наблюдали отрицательный результат, т.е. CD38 не связывался с эритроцитами (табл. 15).



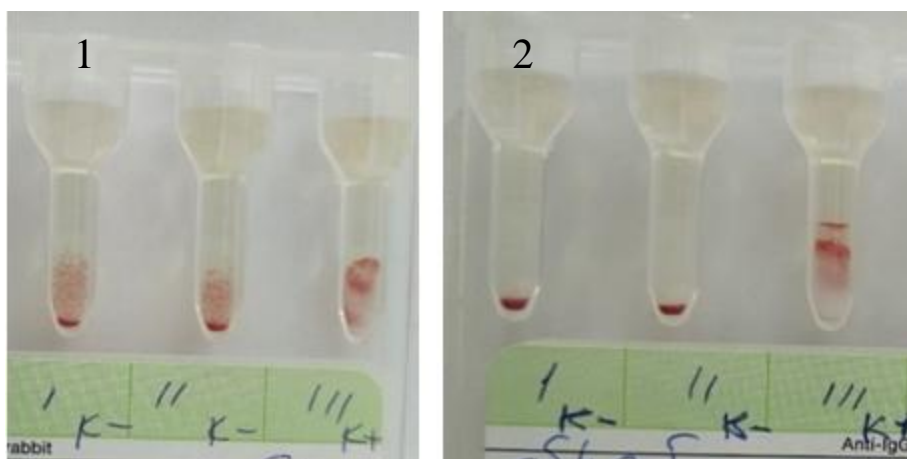
Таблица 15 Связывание CD38 с тест-эритроцитами для скрининга аллоантител

Показатель	Значения (M±m)	p
СИФ CD38 на тест-эритроцитах для скрининга аллоантител	90.26±0.39	p< 0, 00000001
СИФ CD38 на тест-эритроцитах для скрининга аллоантител (после отмывания)	19.05±0.07	

Примечание: разница достоверности указана согласно t-критерия Стьюдента

Таким образом, положительный результат скрининга аллоантител вероятно связан с тем, что среда, в которой находятся тест-эритроциты, содержит фрагменты рецепторов, которые схожи по химической структуре с белком CD38 и, вероятно, комплементарно связываются с антителами против CD38.

Для решения данной проблемы мы разработали методический подход, основанный на обработке донорских тест-эритроцитов для скрининга и идентификации антител диагностическим реагентом «Моноклональное антитело CD38(Fab2)». Установлено, что данная обработка на этапе пробоподготовки позволяет нейтрализовать неспецифическую агглютинацию в образцах плазмы, содержащей лекарственный препарат даратумумаб, что дает возможность достоверно определить специфичность клинически значимых антиэритроцитарных аллоиммунных антител (рис 6).

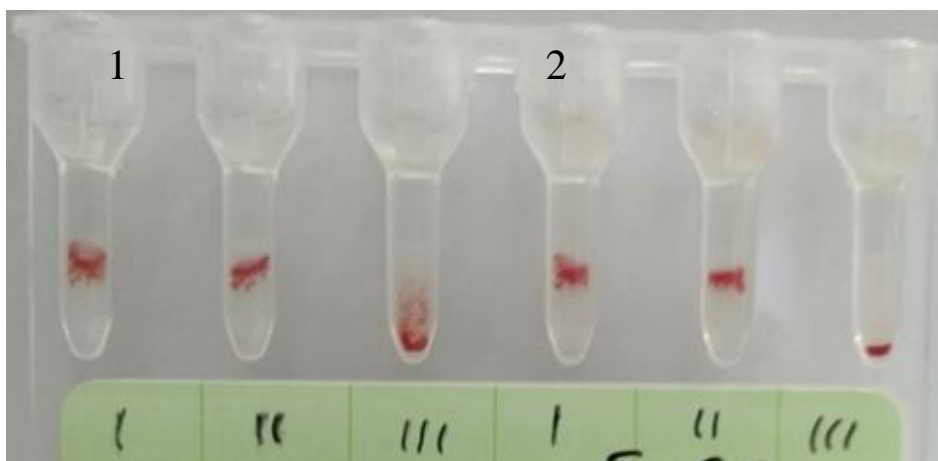


1-Тест-эритроциты не обработаны ДР МА CD38(Fab2);  
2- Тест-эритроциты обработаны ДР МА CD38(Fab2).

Рисунок 6 – Скрининг антител с обработанными и необработанными тест-эритроцитами в образцах плазмы, содержащих анти-К антитела

Обработка ДР МА к CD38 сохраняет экспрессию антигенов эритроцитов, позволяя обнаруживать в НАГТ клинически значимые антитела к антигенам всех систем групп крови, что является несомненным преимуществом в сравнении с общепринятой технологией обработки дитиотреитолом (ДТТ).

Эффективность разработанного методического подхода была оценена в 36 образцах крови больных ММ, получавших терапию лекарственным препаратом даратумумаб. Во всех образцах при первичном скрининге были получены сомнительные результаты скрининга антиэритроцитарных антител. После обработки тест-эритроцитов по разработанному протоколу неспецифической агглютинации не выявлено. В одном образце результат скрининга расценен как положительный. В результате идентификации антител была установлена специфичность аллоантител: анти-D (рис.7).



1-Тест-эритроциты не обработаны ДР МА CD38(Fab2);  
2- Тест-эритроциты обработаны ДР МА CD38(Fab2).

Рисунок 7 – Результат скрининга аллоантител у аллоиммунизированного больного, получающего терапию препаратом Даратумумаб

Шести больным понадобились трансфузии эритроцитной взвеси. Реакций и осложнений после трансфузий зарегистрировано не было.

На основании проведенных исследований разработан алгоритм скрининга антиэритроцитарных аллоантител, определения их специфичности и подбора гемокомпонентов у больных множественной миеломой, получающих терапию лекарственным препаратом даратумумаб (рис. 8).



Рисунок 8 – Алгоритм скрининга антиэритроцитарных аллоантител, определения их специфичности и подбора гемокомпонентов у пациентов с ММ, получающих терапию лекарственным препаратом даратумумаб

Таким образом, в результате последовательного решения поставленных задач в ходе выполнения диссертационного исследования достигнута цель исследования, а именно разработаны научно-методические и молекулярно-биологические подходы к выявлению антигенов и антител к эритроцитам и нейтрофилам для обеспечения безопасности трансфузий компонентов крови у пациентов с гематологическими заболеваниями.

Полученные результаты исследований и разработанные методические подходы открывают перспективу для дальнейшего изучения иммуногенетических основ аутосенсibilизации и аллоиммунизации антигенами HNA, расширения представлений о влиянии трансфузий компонентов крови на функции нейтрофилов. Внедрение новых методов исследования требует оптимизации деятельности лаборатории, включая систему менеджмента качества.

## ВЫВОДЫ

1. Разработанная методика HNA-типирования методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции, позволяющая оценить популяционные особенности распределения HNA и оценить риск аллоиммунизации, характеризуется высокой аналитической чувствительностью и специфичностью 1,0.

2. Установлено, что частота встречаемости генотипов HNA у пациентов с гематологическими заболеваниями и доноров Северо-Западного региона РФ не имеют статистически значимых различий. Генотип HNA-3bb, ассоциируемый с высоким риском развития TRALI, определен у 3,7% и 4,5% реципиентов и доноров крови, соответственно. Наиболее высокий риск аллоиммунизации выявлен у реципиентов при отсутствии в генотипе аллелей HNA-5b, HNA-1a, HNA-3b и составляет 0,250, 0,233, 0,231 соответственно.

3. Разработанный метод выявления антител к антигенам систем HNA с помощью проточной цитофлуориметрии позволяет определять ауто- и аллоиммунные анти-HNA антитела классов G и M. Уровень аллоиммунизации к HNA в общей популяции доноров крови составляет 0,35%, у доноров женского пола – 0,81%, что достоверно ниже, чем у реципиентов (3,17%). Для пациентов с апластической анемией,  $\beta$ -талассемией и гемофилией характерен высокий уровень аллоиммунизации (16,7% и 10,7% соответственно).

4. Разработанный алгоритм лабораторной диагностики для иммунной нейтропении позволяет выявить различия в генотипах систем HNA и дифференцировать аутоиммунные и аллоиммунные антитела к антигенам систем HNA. Аутоиммунные антитела к антигенам систем HNA выявлены у 3,37% взрослых пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями. Уровень аутоиммунизации у взрослых пациентов и детей в возрастной группе до 1 года с первично выявленной нейтропенией составляет 0,9% и 65,9% соответственно.

5. Установлено, что снижение концентрации анти-A и/или анти-B антител (13,2%), снижение экспрессии антигенов систем ABO и Rh (1,9%), наличие химеризма (9,9%) и панаггютинации (1,4%) обуславливают сложность интерпретации результатов типирования групп крови эритроцитов по системам ABO и Rh у пациентов с гематологическими заболеваниями. Изменение экспрессии антигенов эритроцитов встречалось только у пациентов с миелолифферативными неоплазиями (1,9%) и не встречалось у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями. Снижение концентрации анти-A/анти-B антител достоверно чаще выявляли у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, чем у пациентов с миелолифферативными неоплазиями (85,71% и 8,04%,  $p < 0,05$  соответственно).

6. Молекулярно-генетическое типирование позволяет с высокой степенью точности определить группы крови по системам Rh и Kell у реципиентов компонентов крови с трансфузионным химеризмом. Расхождения результатов

серологического и молекулярно-генетического типирования групп крови в образцах крови пациентов выявлены в 45,3% случаев.

7. Положительный результат скрининга аллоантител у гематологических пациентов выявлен в 8,6% случаев: в 6,5% случаев отличался сложностью интерпретации, связанной с наличием аутоиммунных антител в плазме (0,6%) и перекрестно-реагирующих антител (5,9%), а в 2,1% случаев были выявлены антиэритроцитарные аллоантитела. Аллоиммунные антитела к антигенам эритроцитов чаще выявляли в группе пациентов с апластической анемией и  $\beta$ -талассемией (14,3%), гемофилией (9,2%) и тромбофилией (6,9%). Наличие неспецифических перекрестно-реагирующих антител характерно для пациентов с множественной миеломой (19,2%).

8. Разработанные алгоритмы позволяют определить группу крови по системам АВО и Rh в сложных случаях, дифференцировать перекрестно-реагирующие, лекарственные антитела, не имеющие клинического значения, и аутоиммунные и/или аллоиммунные антитела, имеющие клиническое значение. Использование предлагаемых алгоритмов позволило в сложных случаях осуществить подбор реципиентам совместимых эритроцитных компонентов в 96% случаев.

9. У пациентов с множественной миеломой, получающих терапию даратумумабом, в 100% случаев наблюдается неспецифическое связывание лекарственных антител из плазмы реципиента с донорскими эритроцитами в непрямом антиглобулиновом тесте. Разработан алгоритм скрининга и идентификации антиэритроцитарных аллоиммунных антител у пациентов с множественной миеломой, позволяющий дифференцировать лекарственные антитела и клинически значимые антитела к трансфузионно опасным антигенам систем групп крови эритроцитов.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Для обеспечения совместимыми компонентами крови аллоиммунизированных пациентов целесообразно в учреждениях службы крови создавать регистр доноров, типированных по антигенам системы HNA.

2. Для диагностики иммунной нейтропении рекомендовано определение как иммунологических, так и генетических показателей с использованием разработанных методов типирования HNA и определения антител к антигенам нейтрофилов.

3. Для повышения достоверности результатов определения групп крови эритроцитов по системам АВО, Rh и скрининге антител у пациентов с гематологическими заболеваниями целесообразно учитывать выраженность экспрессии антигенов эритроцитов и продукцию антител, включая патологические.

4. Для повышения эффективности применения компонентов крови у гематологических больных с трансфузионным химеризмом целесообразно

использовать метод молекулярно-генетического типирования групп крови эритроцитов.

5. Для проведения скрининга аллоиммунных антиэритроцитарных антител у пациентов с множественной миеломой, получающих терапию даратумумабом, рекомендовано на этапе пробоподготовки проводить обработку донорских тест-эритроцитов в соответствии с разработанным алгоритмом, позволяющим дифференцировать лекарственные и антиэритроцитарные клинически значимые антитела.

## **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации**

1. 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 // Онкогематология. – 2013. – Т. 8. № 4. – С. 13-17.

2. Аллосенсибилизация к антигенам эритроцитов / Н.В. Минеева, И.А. Пашкова, **И.И. Кробинец**, Е.А. Сысоева // Онкогематология. – 2015. – Т. 10. № 4. – С. 60-65.

3. Особенности Экспрессии CD38 Т-лимфоцитами периферической крови / И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, А.Я. Давыдова, **И.И. Кробинец**, А.А. Савченко, М.К. Серебрякова // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 42-47.

4. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии / И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, **И.И. Кробинец**, А.А. Савченко, М.К. Серебрякова // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17. № 6. – С. 525-538.

5. Оптимизация подбора совместимых пар "донор-реципиент": роль скрининга антител и фенотипирования антигенов эритроцитов реципиентов при гемотрансфузиях / Н.В. Минеева, И.А. Пашкова, **И.И. Кробинец**, С.В. Гавровская, Е.А. Сысоева, Н.Н. Бодрова // Трансфузиология. – 2015. – Т. 16. № 2. – С. 52-59.

6. Значение исследования аллоантител у женщин при беременности / Н.В. Минеева, И.А. Пашкова, **И.И. Кробинец** // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 6. – С. 67-70.

7. Применение прямого антиглобулинового теста для выявления аутоантител при анемиях различного генеза / Н.В. Минеева, **И.И. Кробинец**, Н.Н. Бодрова, И.О. Богданова // Онкогематология. – 2017. – Т. 12. № 3. – С. 57-62.

8. Оценка вероятности подбора пар "донор-реципиент" с учетом фенотипа антигенов эритроцитов / Н.В. Минеева, С.В. Гавровская, **И.И. Кробинец**, Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева, И.В. Поединенко, И.О. Богданова // Трансфузиология. – 2017. – Т. 18. № 4. – С. 53-62.

9. Частота и структура осложнений, возникших после переливания донорской крови и ее компонентов в медицинских организациях Российской Федерации в 2014-2017 годах / О.В. Эйхлер, А.В. Четкин, Е.А. Бурдинская, И.Б. Власов, В.В. Данильченко, Н.В. Минеева, **И.И. Кробинец**, В.Е. Солдатенков // Трансфузиология. – 2018. – Т. 19. № 4. – С. 4-14.

10. **Кробинец И.И.** Значение типирования антигенов нейтрофилов у доноров для деятельности службы крови / **И.И. Кробинец**, Н.В. Минеева, И.О. Богданова, Е.А. Сысоева, И.В. Поединенко, Н.Н. Бодрова, С.В. Гавровская, А.В. Четкин // Трансфузиология. – 2018. – Т. 19. № 4. – С. 23-31.

11. **Кробинец И.И.** Частота встречаемости антигенов нейтрофилов человека и риск аллоиммунизации у доноров и больных гематологическими заболеваниями / **И.И. Кробинец**, Н.В. Минеева, И.О. Богданова, А.В. Четкин // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 2. – С. 48-54.

12. **Кробинец И.И.** Особенности интерпретации результатов исследований антигенов и антител АВО и резус у пациентов с гематологическими заболеваниями / **И.И. Кробинец**, Н.В. Минеева, Е.А. Сысоева, А.В. Четкин // Сибирский научный медицинский журнал. – 2020. – Т. 40. № 5. – С. 66-72.

13. **Кробинец И.И.** Частота и специфичность аллоантител к антигенам систем HNA у доноров крови и её компонентов / **И.И. Кробинец**, Н.В. Минеева, И.О. Богданова, И.В. Кудрявцев, А.В. Четкин // Казанский медицинский журнал. – 2020. – Т. 101. № 2. – С. 182-187.

14. Генотипирование групп крови эритроцитов для пациентов с множественными трансфузиями / Н.В. Минеева, **И.И. Кробинец**, С.В. Гавровская, Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева, А.В. Четкин, С.С. Бессмельцев // Казанский медицинский журнал. – 2021. – Т. 102. № 5. – С. 621-625.

15. **Кробинец И.И.** Особенности интерпретации результатов скрининга антиэритроцитарных антител у пациентов с гематологическими заболеваниями / **И.И. Кробинец**, Н.В. Минеева, Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева, С.В. Гавровская, С.В. Сидоркевич, С.С. Бессмельцев // Казанский медицинский журнал. – 2022. – Т.103, №1. – С. 14-22.

#### Публикации в других изданиях

1. Минеева Н.В. Итоги внешней оценки качества иммуногематологических исследований в 2011-2013 гг / Н.В. Минеева, И.Л. Хайдукова, **И.И. Кробинец**, Н.Н. Бодрова, В.Н. Малахов, Е.А. Сысоева // Вестник Службы Крови России. – 2015. – № 4. С. – 17–23.

2. Минеева Н.В. Анализ сложно диагностируемых вариантов антигена D при определении резус-принадлежности / Н.В. Минеева, С.В. Гавровская,

Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева, **И.И. Кробинец**, И.В. Поединенко // Трансфузиология. – 2017. – Т. 18, № 2, S1.- С. 31-32

3. **Кробинец И.И.** Особенности иммуногематологических исследований у реципиентов компонентов крови с гематологическими заболеваниями / И.И. Кробинец, Н.В. Минеева, А.В. Чечеткин, Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева, И.О. Богданова // Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства крови: Сборник тезисов III Евразийского конгресса трансфузиологов. – Астана, 2018. – С. 101–102.

4. Voluntary non-remunerated blood donation in the Russian Federation / A. Chechetkin, V. Danilchenko, A. Makeev, **I. Krobinets** // Vox. Sang. – 2018. – Vol. 113, Sl. 1. – P. 126.

5. **Кробинец И.И.**, Диагностическое значение прямого антиглобулинового теста для выявления аутоантител у пациентов с анемией / И.И. Кробинец, Н.В. Минеева, И.О. Богданова, А.В. Чечеткин // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63, № 1S.1. – С. 146.

6. **Krobinets I.** The expression level of CD 177 is increased in patients with chronic lymphoproliferative diseases and myeloid neoplasias / I. Krobinets, N. Mineeva, A. Chechetkin, I. Bogdanova / Abstracts of 23th Congress of the European Hematology Association // Hemaspere. – 2018. – Vol. 2, S1. – P 845.

7. Allelic polymorphism of platelet glycoprotein genes gpiia and gpiib as a possible predictive marker of response to therapy in patients with primary immune thrombocytopenia / I. Zotova, S. Kapustin, N. Mineeva, **I. Krobinets**, I. Pavlova, S. Bessmeltsev, A. Chechetkin, S. Gritsaev // Abstracts of 24th Congress of the European Hematology Association // Hemaspere. – 2019. – Vol. 3, S1. – P 378.

8. **Кробинец И.И.** Антигены нейтрофилов человека: частота встречаемости и риск аллоиммунизации // И.И. Кробинец, Н.В. Минеева, И.О. Богданова, Е.А. Сысоева, И.В. Поединенко, Н.Н. Бодрова, С.В. Гавровская, А.В. Чечеткин // Трансфузиология. – 2019. – Т. 20, № 2, S. 1. – С. 48-50.

9. **Krobinets I.** Human neutrophil antigen allele frequencies and assessment of HNA alloimmunization risk in blood donors and recipients / I. Krobinets, N. Mineeva, I. Bogdanova, A. Chechetkin // Vox Sanguinis. – 2019. – Vol.114, S. 1. – P. 198.

10. Выявление аутоантител к антигенам систем HNA и HPA у больных лимфопролиферативными заболеваниями / Н.В. Минеева, **И.И. Кробинец**, И.О. Богданова, А.В. Чечеткин, Е. Р. Шилова // Гематология и трансфузиология. – 2020. – Т. 65, №1. – С. 181.

11. **Krobinets I.** Interpretation of the results of ABO, RH antigens and antibodies determination in patients with hematological diseases / I. Krobinets, S. Voloshin, N. Mineeva I., Bogdanova, A. Kuvshinov, A. Chechetkin // HemaSphere. – 2020Vol.4, S.1. – P.751.

12. **Krobinets I.** Frequency and specificity of alloantibodies to HNA system antigens in blood donors / Krobinets I., Chechetkin A., Mineeva N., Bogdanova I. // Vox Sanguinis. – 2020. – Vol. 115, S.1. – P. 293.



13. **Krobinets I.** Transfusion-dependent patient's blood group genotyping / I Krobinets, N Mineeva, S Gavrovskaya, A Chechetkin // Vox Sanguinis. –2021 – Vol. 116, S1.- P. 40.

14. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у пациентов с апластической анемией: проблемы, особенности, анализ клинического наблюдения / Е.Р. Шилова, Т.В. Глазанова, Ж.В. Чубукина, О.Е. Розанова, М.Н. Зенина, А.В. Сельцер, **И.И. Кроби́нец**, В.Ю. Удальева, И.И. Зотова, Л.В. Стельмашенко, Н.А. Романенко, Т.Б. Замотина, И.В. Хоршева, С.В. Волошин // Клиническая онкогематология. – 2019. – Т. 12. № 3. – С. 319-328.

15. Характеристика осложнений, возникших после переливания донорской крови и ее компонентов, в медицинских организациях Российской Федерации в 2018 году / О.В. Эйхлер, А.В. Чечеткин, Е.В. Аджигитова, В.В. Данильченко, Н.В. Минеева, В.Е. Солдатенков, **И.И. Кроби́нец** // Трансфузиология. – 2019. – Т. 20, № 4. – С. 301-309.

16. Характеристика реакций и осложнений, возникших в связи с трансфузией донорской крови и ее компонентов, в медицинских организациях российской федерации в 2019 году / О.В. Эйхлер, А.В. Чечеткин, Е.В. Аджигитова, В.В. Данильченко, Н.В. Минеева, **И.И. Кроби́нец**, В.Е. Солдатенков // Трансфузиология. – 2020. – Т. 21, № 4. – С. 304-312.

17. Современные методические подходы к проведению иммуногематологических исследований у доноров и реципиентов крови и ее компонентов / Н.В. Минеева, **И.И. Кроби́нец**, С.В. Гавровская, Н.Н. Бодрова, Е.А. Сысоева, А.В. Чечеткин, В.А. Струменталева // Трансфузиология. – 2021. – Т.22, №3. – С. 249-257.

18. Возможности применения аутологичной крови и ее компонентов у пациентов с наследственными нарушениями гемостаза / В.Е. Солдатенков, К.А. Комиссаров, В.В. Бураков, Л.П. Папаян, Н.В.Минеева, С.С. Бессмельцев, А.Д. Касьянов, И.С. Голованова, О.В. Солдатенкова, О.Х. Кузакбирдиева, **И.И. Кроби́нец** // Трансфузиология. – 2021. – Т.22, №4. – С.328–342.

19. **Ноу-хау** Метод выявления ауто/аллоантител к антигенам нейтрофилов методом проточной цитофлуориметрии: №388-03-168 от 04.02.16, №388-03-088 от 30.01.2017, №388-03-2018-181 от 29.01.2018 Заказчик: ФМБА России Исполнитель ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России

20. Минеева, Н. В. Алгоритмы индивидуального подбора гемокомпонентов и проведения исследования антигенов эритроцитов и антиэритроцитарных антител в сложно диагностируемых случаях. Методическое пособие / Н. В. Минеева, **И. И. Кроби́нец**, Н. Н. Бодрова, Е. А. Сысоева, С. В. Гавровская, И. В. Поединенко, И. О. Богданова, А. В. Чечеткин, С. С. Бессмельцев // СПб., Агентство «ВиТ-принт», 2018. — 24 с.

21. Заявление о выдаче патента на изобретение № 2021112324 от 27.04.2021 «Способ диагностики иммунной нейтропении»

22. Заявка о выдаче патента на изобретение № 2021138610 от 22.12.2021 «Способ определения аллоиммунных антиэритроцитарных антител у больных множественной миеломой».

### Список сокращений

АА	апластическая анемия
АИГА	аутоиммунная гемолитическая анемия
АИН	аутоиммунная нейтропения
АНН	аллоиммунная нейтропения новорожденного
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ВКЛ	волосатоклеточный лейкоз
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИП	истинная полицитемия
ЛХ	лимфома Ходжкина
МА	моноклональные антитела
МДС	миелодиспластический синдром
ММ	множественная миелома
НАГТ	непрямой антиглобулиновый тест
НХЛ	неходжкинская лимфома
ОЛ	острый лейкоз
ОЛЛ	острый лимфобластный лейкоз
ОМЛ	острый миелобластный лейкоз
ПАГТ	прямой антиглобулиновый тест
ПМФ	первичный миелофиброз
ПНГ	пароксизмальная ночная гемоглобинурия
ПТО	посттрансфузионные осложнения
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ХЛЛ	хронический лимфолейкоз
ХЛПЗ	хроническое лимфопролиферативное заболевание
ХМЛ	хронический миелоидный лейкоз
ХМПН	хроническая миелополиферативная неоплазия
CD	кластер дифференцировки
DTT	dithiothreitol (дитиотреитол)
HLA	Human Leukocyte Antigens человеческие лейкоцитарные антигены (главный комплекс гистосовместимости) человека)
HNA	Human Neutrophil Antigens (антигены нейтрофилов человека)
HPA	Human Platelet Antigens (антигены тромбоцитов человека)
IgG	иммуноглобулин класса G
IgM	иммуноглобулин класса M
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury – трансфузионно-ассоциированное поражение легких