

Детекция тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента у больных апластической анемией и гемобластозами

А.Ф. Рахмани¹, Е.А. Михайлова¹, И.В. Гальцева¹, Ю.О. Давыдова¹, Н.М. Капранов¹, И.В. Дубинкин^{1,2,3}, С.М. Куликов¹, Т.В. Гапонова¹, З.Т. Фидарова¹, В.В. Троицкая¹, Е.Н. Паровичникова¹, В.Г. Савченко¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Анжелика Фаридовна Рахмани angelique.r86@mail.ru

Введение. При развитии иммунологической рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов наряду с антитромбоцитарными (анти-HLA и анти-HPA) аллоантителами, а также специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами могут вырабатываться дополнительные маркеры, такие как тромбоцитассоциированные иммуноглобулины (РАIgG/M/A) и компоненты системы комплемента (РАСЗ/С4), что может способствовать повышенному разрушению тромбоцитов при трансфузиях и усугублять рефрактерность. Эти маркеры можно выявить с помощью двойного окрашивания тромбоцитов в реакции прямой поверхностной иммунофлуоресценции и последующим детектированием методом проточной цитометрии.

Цель исследования – изучить дополнительные факторы, усугубляющие течение рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов у больных апластической анемией (АА) и гемобластозами.

Материалы и методы. С 9 ноября 2016 г. по 28 апреля 2018 г. в клиниках центра наблюдались 77 больных в возрасте 19–71 года (медиана – 36 лет), среди них мужчин – 33, женщин – 44. Распределение больных: АА – 47 (61 %); миелодиспластический синдром (МДС) – 10 (13 %); острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – 20 (26 %). Во всех группах больных проводили определение РАIgG/M/A, РАСЗ/С4 и сравнительный анализ плотности фиксации по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) с помощью двойного окрашивания (CD41a-PE; IgA, M, G-FITC; C3/C4-FITC). Характеристика РАIgG/M/A и РАСЗ/С4 подробно изучалась в группе больных АА на разных этапах терапии и при развитии рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов. В качестве отрицательного контроля плотности фиксации иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента на тромбоцитах проанализированы данные 28 здоровых доноров.

Результаты. Обнаружено, что СИФ РАIgG/M/A и РАСЗ/С4 была выше во всех группах больных (АА, МДС, ОМЛ) по сравнению с донорами. В группах больных АА, ОМЛ, МДС выявляется высокая плотность фиксации на поверхности тромбоцитов РАIgM и РАIgA, а также сочетание РАIgM/A, РАIgM/C3/C4 и РАIgA/C3/C4. Постоянная трансфузионная нагрузка сопровождается появлением РАIgA и РАСЗ, а при развитии аллоиммунизации и рефрактерности к трансфузиям появляются также РАIgM и РАС4. Среди больных АА на фоне постоянной трансфузионной нагрузки с развитием рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов, а также при множественных инфекционных осложнениях обнаруживается высокая плотность фиксации РАIgM, РАIgA, а при рецидиве АА наблюдалось повышение СИФ РАСЗ.

Заключение. В дополнение к применению определенного алгоритма трансфузионной терапии также необходимо осуществлять определение РАIgG/M/A и РАСЗ/С4 для прогнозирования усиления рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов.

Ключевые слова: рефрактерность к трансфузиям донорских тромбоцитов, определение тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента, средняя интенсивность флуоресценции, трансфузия концентратов тромбоцитов

Для цитирования: Рахмани А.Ф., Михайлова Е.А., Гальцева И.В. и др. Детекция тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента у больных апластической анемией и гемобластозами. Онкогематология 2019;14(3):38–51.

DOI: 10.17650/1818-8346-2019-14-3-38-51

Detection of platelet-associated immunoglobulins and complement system components in patients with aplastic anemia and hemoblastosis

A.F. Rakhmani¹, E.A. Mikhaylova¹, I.V. Galtseva¹, Yu.O. Davidova¹, N.M. Kapranov¹, I.V. Dubinkin^{1,2,3}, S.M. Kulikov¹, T.V. Gaponova¹, Z.T. Fidarova¹, V.V. Troitskaya¹, E.N. Parovichnikova¹, V.G. Savchenko¹

¹National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zыkovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Build 1, 2/1 Barrikadnaya St., Moscow 125993 Russia

Background. In addition to anti-HLA-I and anti-HPA-antibodies and specific cytotoxic T-lymphocytes, another cause of immune refractoriness to donor's platelet transfusions could be a platelet-associated different classes immunoglobulins PAIg (G, M, A) and C3/C4-components of complement system (PAC3, PAC4). These markers can be detected by flow cytometry of double-stained platelets. The fixation density of immunoglobulins and components of complement systems were measured by the mean fluorescence intensity (MFI).

Objective: to study additional factors that aggravate the course of refractoriness to donor's platelet transfusions in patients with aplastic anemia (AA) and hemoblastosis.

Materials and methods. 77 patients (AA — 47, myelodysplastic syndrome (MDS) — 10, acute myeloid leukemia (AML) — 20) admitted to National Research Centre for Hematology during 11.09.2016–04.28.2018 were enrolled in the study. M/f ratio was 33/44, median age was 36 yrs. (19–71 yrs.). Plasmapheresis and cross-matching for PRP selection were used for patients with refractoriness to donor's platelet transfusion. PAIg (G, M, A) and PAC3/C4 detection and density (MFI) were evaluated in all patients by flow cytometry of double-stained platelets (CD41a-PE; IgA, M, G-FITC; C3/C4-FITC) and MFI measurement. Patients with AA were investigated on different stages of therapy and if refractoriness to donor's platelet transfusion is developed. Blood donors (n = 28) MFI measurement results were established as negative control.

Results. It was found that MFI PAIgG/M/A and PAC3/C4 was higher in all groups of the patients (AA, MDS, AML), as compared with donors. MFI of PAIgM and PAIgA in patients were significant higher than MFI of PAIgG and PAC3/C4. Combination of PAIgM/A, PAIgM/C3/C4 and PAIgA/C3/C4 were more frequent. Multiple transfusions of PRP were associated with PAIgA and PAC3 detection. Development of refractoriness to donor's platelet transfusions was accompanied by alloantibodies (HLA-I, HPA) and PAIgM, PAC4 detection. In patients of AA group during development of refractoriness to donor's platelet transfusions and multiple infection complications the high density of PAIgM and PAIgA were identified. Relapse of AA was accompanied MFI of PAC3 density increment.

Conclusion. In addition to application of a certain transfusion therapy algorithm it is also necessary to detect PAIg (G, M, A) and PAC3/C4 for prediction of severe refractoriness to donor's platelet transfusions.

Key words: refractoriness to donor's platelet transfusions, detection of platelet-associated immunoglobulins and complement system components, mean fluorescence intensity, platelet concentrate transfusion

For citation: Rakhmani A.F., Mikhaylova E.A., Galtseva I.V. et al. Detection of platelet-associated immunoglobulins and complement system components in patients with aplastic anemia and hemoblastosis. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2019;14(3):38–51.

Введение

Трансфузии концентратов тромбоцитов (КТ) в настоящее время являются основным эффективным методом профилактики и лечения геморрагических осложнений при глубокой тромбоцитопении у больных с заболеваниями системы крови. Тромбоцитопения, обусловленная необходимостью проведения заместительных трансфузий, развивается в результате различных патогенетических механизмов, а также является следствием цитостатического воздействия лекарственных препаратов [1–3]. Наиболее высокая трансфузионная нагрузка, связанная с применением КТ, наблюдается у пациентов с острыми лейкозами и депрессиями кроветворения, что, в свою очередь, часто приводит к аллоиммунизации антигенами Human Leukocyte Antigen (HLA) класса I (преимущественно HLA-A и HLA-B) и специфическими Human Platelet Antigens (HPA), что влечет к развитию иммунной рефрактерности [4–6]. Трансфузии донорских тромбоцитов у таких пациентов неэффективны и сопряжены с риском развития посттрансфузионных негемолитических реакций различной степени тяжести. Проведение современного программного лечения этой категории больных становится затруднительным, у них чаще развиваются выраженный геморрагический синдром и инфекционные осложнения, что в конечном итоге значительно снижает эффективность лечения и выживаемость больных этой категории. Рефрактерность к трансфузиям донорских тромбоцитов может быть обусловлена как иммунными

факторами (выработка антитромбоцитарных антител (анти-HPA, анти-HLA I класса), фиксация антител и компонентов комплемента на поверхности тромбоцитов, активация цитотоксических Т-лимфоцитов), так и неиммунными факторами (лихорадка, сепсис, пульмонологические заболевания, инфекции, спленомегалия, синдром диссеминированного внутрисудистого свертывания (ДВС-синдром)) [4, 7, 8].

В настоящее время актуальным также является поиск новых дополнительных факторов, способствующих быстрому развитию рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов, в том числе тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов (platelet-associated immunoglobulins, PAIg) и тромбоцитассоциированных компонентов системы комплемента C3/C4 (platelet-associated complement components, PAC3/C4).

Как описано в литературе, на поверхности тромбоцитов имеются Fc-рецепторы, за счет которых PAIg и PAC3/C4 фиксируются на тромбоцитах больного, что усугубляет течение рефрактерности к проводимой трансфузионной терапии КТ [5, 9, 10]. В основе образования тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента лежит активация тромбоцитов и, вероятно, развитие аутоиммунных процессов, при которых в результате частых трансфузий и длительных воспалительных процессов увеличивается выработка иммуноглобулинов, реагирующих не только с тромбоцитами донора, но и с тромбоцитами реципиента [5, 11, 10]. Одним из современных методов детекции

тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента у трансфузионозависимых больных считается проточная цитофлуориметрия [12–14]. Метод стал применяться у пациентов с тромбоцитопенией в последние десятилетия и является одним из ведущих методов для идентификации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов разных классов (IgM, IgG и IgA) и компонентов системы комплемента (C3/C4) [14–18]. С помощью механизма шеддинга (shed – сход с поверхности клетки) тромбоцитассоциированные иммуноглобулины могут переходить в плазму больного в виде циркулирующих иммунных комплексов или агрегатов иммуноглобулинов и активированных компонентов системы комплемента [19]. Отщепление тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов с мембраны может происходить также при активации и апоптозе тромбоцитов. При трансфузиях тромбоцитов возможен шеддинг гликопротеиновых рецепторов мембраны тромбоцитов [19–21]. В результате формируется порочный круг за счет образования специфических циркулирующих антитромбоцитарных аллоантител, тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и белков системы комплемента, усиливающих фагоцитоз и апоптоз тромбоцитов. Все это значительно усугубляет рефрактерность и приводит к тяжелым геморрагическим осложнениям [15, 16, 21, 22].

Компонент С3 системы комплемента является ключевым белком острой фазы воспалительного процесса, участвует во всех 3 путях активации системы комплемента, необходим для опсонизации чужеродных

клеток и облегчает фагоцитоз. Компонент С4 системы комплемента участвует только в классическом пути активации комплемента. Классический путь активации системы комплемента подразумевает присутствие комплексов антиген – антитело. Исследование С3- и С4-компонентов системы комплемента используют для диагностики, мониторинга и контроля за эффективностью терапии аутоиммунных заболеваний, для диагностики первичных иммунодефицитов, для оценки иммунного статуса при частых инфекционных осложнениях [15, 17].

Цель исследования – изучить дополнительные факторы, усугубляющие течение рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов у больных апластической анемией (АА) и гемобластозами (миелодиспластический синдром (МДС) и острый миелоидный лейкоз (ОМЛ)).

Материалы и методы

Исследование носило проспективный характер у пациентов с АА и МДС/ОМЛ в целях выявления плотности фиксации (по средней интенсивности флуоресценции (СИФ) тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента С3/С4 на поверхности тромбоцитов и определения их клинического значения в различных группах больных: до лечения, на фоне лечения, в ремиссии и при рефрактерном течении заболевания, а также при развитии рефрактерности к трансфузиям и при множественных трансфузиях тромбоцитов в анамнезе за период наблюдения с ноября 2016 г. по апрель 2018 г. (рис. 1).

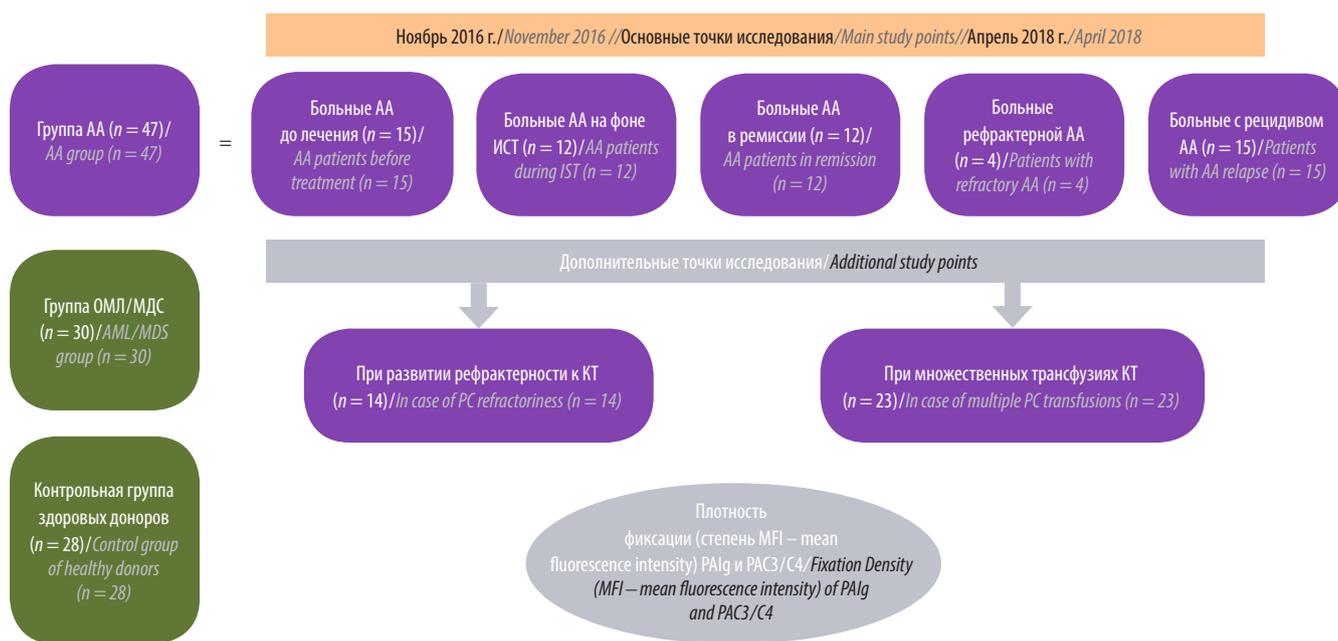


Рис. 1. Дизайн исследования. АА – апластическая анемия; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; МДС – миелодиспластический синдром; ИСТ – иммуносупрессивная терапия; КТ – концентрат тромбоцитов
Fig. 1. Study design. AA – aplastic anemia; AML – acute myeloid leukemia; MDS – myelodysplastic syndrome; IST – immunosuppressive therapy; PC – platelet concentrate

Были выполнены следующие этапы: сформулированы критерии включения больных, подписавших информированное согласие на обследование и лечение, а также об участии в исследовании (табл. 1).

Всем больным при поступлении в НМИЦ гематологии проводили подробное обследование. Диагноз АА устанавливали согласно критериям протокола программного лечения больных АА [1, 23, 24]: трехростковая цитопения: анемия (уровень гемоглобина <110 г/л), гранулоцитопения (количество гранулоцитов <2,0 × 10⁹/л), тромбоцитопения (количество тромбоцитов <100 × 10⁹/л); снижение клеточности костного мозга, процент бластных клеток менее 2 % и отсутствие мегакариоцитов по данным пунктата костного мозга; аплазия костного мозга в биоптатах подвздошной кости при билатеральной трепанобиопсии.

Больным АА проводили программную иммуносупрессивную терапию, включающую курсы лошадиного антиtimoцитарного глобулина в дозе 20 мг/кг/сут в течение 5 дней, длительную терапию циклоспорином А с индивидуальным подбором дозы. Повторный курс иммуносупрессивной терапии антиtimoцитарным глобулином выполняли больным при отсутствии

гематологического ответа по всем росткам кроветворения через 3 мес и более от предыдущего. В зависимости от клинико-гематологических критериев различали следующие ответы на иммуносупрессивную терапию [23, 25]:

- полная или частичная ремиссия – полная или частичная нормализация показателей гемограммы (уровень гемоглобина >100 г/л, количество гранулоцитов >1,5 × 10⁹/л, количество тромбоцитов >100 × 10⁹/л) и отсутствие потребности в заместительной терапии компонентами донорской крови;
- клинико-гематологическое улучшение показателей гемограммы (уровень гемоглобина >80 г/л, количество гранулоцитов >1 × 10⁹/л, количество тромбоцитов >20 × 10⁹/л), исчезновение или значительное уменьшение зависимости от трансфузий компонентами донорской крови.

Рефрактерное течение АА диагностировали в случае отсутствия эффекта от проводимой комбинированной иммуносупрессивной терапии через 6–9 мес от начала лечения.

Таблица 1. Этапы проспективного исследования

Table 1. Stages of a prospective study

Точки исследования Study points	АА: первичные с единичными трансфузиями компонентов донорской крови или без них с признаками рефрактерности к трансфузиям иммунного генеза с множественными трансфузиями КТ (более 20) АА: primary, with or without single transfusions of donor blood components with immune transfusion refractoriness with multiple PC transfusions (more than 20)	ОМЛ и МДС AML and MDS	Здоровые доноры (отрицательный контроль) Healthy donors (negative control)
Основные Main	До лечения (ИСТ) Before treatment (IST)	Однократное исследование в дебюте заболевания A single investigation in disease onset	Однократное исследование Single investigation
	После первоначального терапевтического воздействия After initial therapy		
	В период ремиссии заболевания In disease remission		
	При рефрактерном течении основного заболевания In case of disease refractoriness		
Дополнительные Additional	При рецидиве In relapse	Нет No	Нет No
	При развитии рефрактерности к трансфузиям With transfusions refractoriness development		
	При множественных трансфузиях КТ (более 20) With multiple PC transfusions (more than 20)		

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 4: АА – апластическая анемия; КТ – концентрат тромбоцитов; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; МДС – миелодиспластический синдром; ИСТ – иммуносупрессивная терапия.

Note. Here and in tables 2 u 4: AA – aplastic anemia; PC – platelet concentrate; AML – acute myeloid leukemia; MDS – myelodysplastic syndrome; IST – immunosuppressive therapy.

Таблица 2. Характеристика больных, включенных в проспективный анализ определения тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента C3/C4

Table 2. Characterization of patients included in a prospective analysis of platelet-associated immunoglobulins and C3/C4 complement components detection

Характеристика Characterization	АА (n = 47) AA (n = 47)	МДС (n = 10) MDS (n = 10)	ОМЛ (n = 20) AML (n = 20)	Доноры (n = 28) Donors (n = 28)
Медиана возраста (диапазон), лет Median of age (range), years	30 (19–64)	48 (22–63)	47 (19–71)	32 (22–46)
Пол, n: Gender, n:				
мужской male	21	5	7	21
женский female	26	5	13	7

Диагноз МДС и ОМЛ также устанавливали согласно критериям протоколов лечения пациентов с МДС и ОМЛ [1, 26]. Все больные, включенные в исследование, получали сопроводительную трансфузионную терапию компонентами донорской крови.

В соответствии с заданными критериями в проспективное исследование были включены 77 больных, которые находились на лечении и обследовании в НИИЦ гематологии с 9 ноября 2016 г. по 28 апреля 2018 г. в возрасте 19–71 года (медиана – 36 лет), среди них мужчин – 33, женщин – 44. Распределение больных по нозологическим вариантам было следующим: 47 (61 %) пациентов с АА, 10 (13 %) – с МДС, 20 (26 %) – с ОМЛ (табл. 2).

В качестве отрицательного контроля плотности фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов комплемента проанализированы данные 28 здоровых доноров в возрасте 22–46 лет (медиана – 32 года), среди них мужчин – 21, женщин – 7. Всего выполнено 178 исследований.

Детекция тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента на поверхности тромбоцитов. Был разработан протокол «Детекция тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента с помощью двойного окрашивания в реакции прямой поверхностной иммунофлуоресценции методом проточной цитофлуориметрии». За основу был взят иммунный метод Trombocyttest immune (Glycotope Biotechnology) для количественного определения иммуноглобулинов на поверхности тромбоцитов с помощью проточной иммунофлуоресценции [27].

Метод прямой поверхностной иммунофлуоресценции позволяет количественно определить плотность фиксированных иммуноглобулинов на мембране тромбоцитов по СИФ, а также идентифицировать класс иммуноглобулинов (IgA, IgM или IgG).

Методика исследования. Материал для исследования – периферическая кровь с антикоагулянтом этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) 7,5 мл для пациентов с тромбоцитопенией, 2 мл – для доноров. В цитометрические пробирки вносили до 4 мл

крови и центрифугировали при 150g в течение 15 мин для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами. В цитометрические пробирки переносили всю полученную обогащенную тромбоцитами плазму, в донорские добавляли 1000 мкл Cell Wash. Далее центрифугировали при 700g в течение 7 мин и выливали надосадочную жидкость, потом вносили 2 мл раствора Cell Wash, тщательно перемешивали на вортексе. Процесс отмывания повторяли еще 2 раза. В последующем переносили осадок в пробирку типа эппендорф и доводили до 500 мкл раствором Cell Wash (до деления 0,5). На гематологическом анализаторе проводили подсчет количества выделенных тромбоцитов, получали $X \times 10^9$ клеток/л. Рассчитывали объем суспензии, в котором содержится 500 тыс. тромбоцитов. Для этого 500 делили на $X =$ количество мкл, которое нужно взять (Y). Далее подготавливали 7 цитометрических пробирок (на 1 пациента), в каждую вносили рассчитанное количество суспензии и доводили суспензию до 50 мкл раствором Cell Wash (50 мкл – Y). В каждую пробирку вносили 5 мкл сыворотки новорожденного теленка (New born Calf Serum, NBСS), перемешивали на вортексе и оставляли минимум на 1 мин при комнатной температуре. После этого проводили окрашивание античеловеческими кроличьими антителами, меченными FITC, к иммуноглобулинам G, A, M и конъюгатами к C3-с и C4 (компоненты системы комплемента), в качестве отрицательного контроля добавляли поликлональные антитела антикроличьи (изотипический контроль) FITC меченные (табл. 3).

Содержимое пробирок перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин в холодильнике при температуре +4 °C. Далее проводили отмывание: добавляли 2 мл Cell Wash и центрифугировали при оборотах 700 g в течение 7 мин, после чего выливали надосадочную жидкость и перемешивали на вортексе. Двойное окрашивание для идентификации и выделения тромбоцитов проводили с помощью добавления 5 мкл анти-CD41a (PE-меченный) в каждую пробирку, перемешивали на вортексе и инкубировали 15 мин в холодильнике при температуре +4 °C. Далее проводили отмывание: добавляли 2 мл Cell Wash

Таблица 3. Конъюгация антителами с суспензией тромбоцитов

Table 3. Antibody conjugation with platelet suspension

№ пробирки Tube number	Антитело Antibody	Объем сыворотки, мкл Serum volume, µl
1	IgG	2 в разбавлении 1:10 2 in dilution 1:10
2	IgM	1
3	IgA	1
4	GAM	1
5	C3	1
6	C4	1
7	Iso-контроль Iso-control	1

и центрифугировали при оборотах 700 g в течение 7 мин, после чего выливали надосадочную жидкость. Добавляли по 100 мкл Cell Wash в каждую пробирку и перемешивали на вортексе. Далее проводили цитометрический анализ на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD-Becton Dickinson).

Цитометрический анализ. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием сине-зеленого лазера FACS Calibur (программное обеспечение CellQuest).

Идентификацию тромбоцитов проводили по окрашиванию моноклональными антителами к CD41a-PE с учетом прямого и бокового светорассеивания. Регистрировали не менее 10000 положительных CD41a-тромбоцитов в каждом тесте (рис. 2).

Вокруг позитивной популяции CD41a-тромбоцитов проводили корректировку по параметрам бокового и прямого светорассеяния для исключения

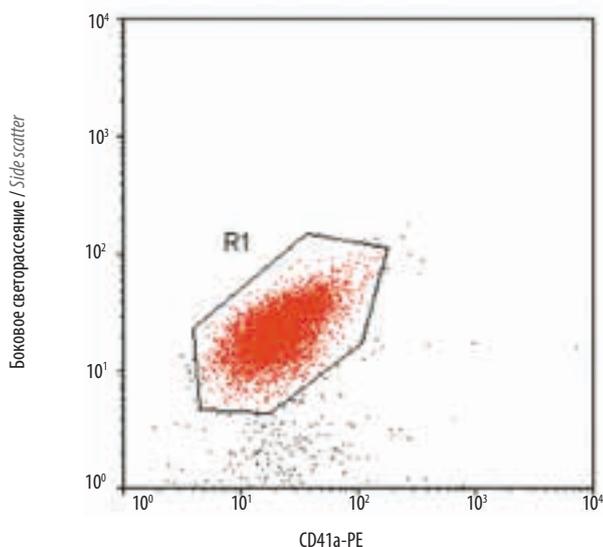


Рис. 2. Регион положительных тромбоцитов CD41a
Fig. 2. CD41a positive platelet region

событий, не относящихся к тромбоцитам (рис. 3). Далее выполняли анализ плотности фиксированных иммуноглобулинов с помощью цитометрических гистограмм у доноров и больных по пороговой СИФ.

Статистический анализ данных проводили с использованием статистического пакета SPSS, версия 10.0.5 (SPSS Inc.). Применяли методы описательной статистики, сравнения выборок, корреляционный анализ (коэффициент корреляции Спирмена). Уровень статистической значимости принят <0,05. Для оценки достоверности различий в 2 независимых выборках использовали непараметрический анализ и метод χ^2 -Пирсона. В целях определения значимости факторов использовали подсчет отношения шансов.

Также у больных с заболеваниями системы крови и рефрактерностью к трансфузиям донорских тромбоцитов применяли зарегистрированный автоматизированный тест на совмещение тромбоцитов (индивидуальный подбор) с помощью метода адгезии на твердой фазе, который позволял одновременно осуществлять скрининг антитромбоцитарных аллоантител (HLA I класса и HPA) и проводить индивидуальный подбор пары донор – реципиент. Этот метод позволял предупредить развитие высокой степени аллоиммунизации и нежелательных посттрансфузионных реакций, а также способствовал преодолению рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов, что позволяло проводить в полном объеме необходимую терапию гематологическим больным [1, 5, 28].

Результаты

Определение тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов G, M, A и тромбоцитассоциированных компонентов системы комплемента C3, C4 у больных апластической анемией и гемобластозами

С помощью цитофлуориметрического анализа детекции тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов комплемента было проведено 178 исследований у 77 больных и 28 доноров (контрольная группа). Больные были распределены в зависимости от нозологической группы: у больных АА (n = 47) проведено 92 исследования, у больных МДС (n = 10) – 18, у больных ОМЛ (n = 20) – 40. У доноров (n = 28) выполнено 28 исследований.

Для разграничения плотности фиксации РАIg и РАС, превышающей или не превышающей порог СИФ, проводили исследования на здоровых донорах в качестве отрицательного контроля. Из всех исследований установили достоверный пороговый уровень плотности фиксации (медиана), которую оценивали как СИФ: РАIgG = 450 относительных единиц, РАIgM = 250 относительных единиц, РАIgA = 300 относительных единиц, РАС3 = 200 относительных единиц, РАС4 = 200 относительных единиц. Оценка СИФ по каналу FITC отражает плотность фиксации и количество фиксированных иммуноглобулинов

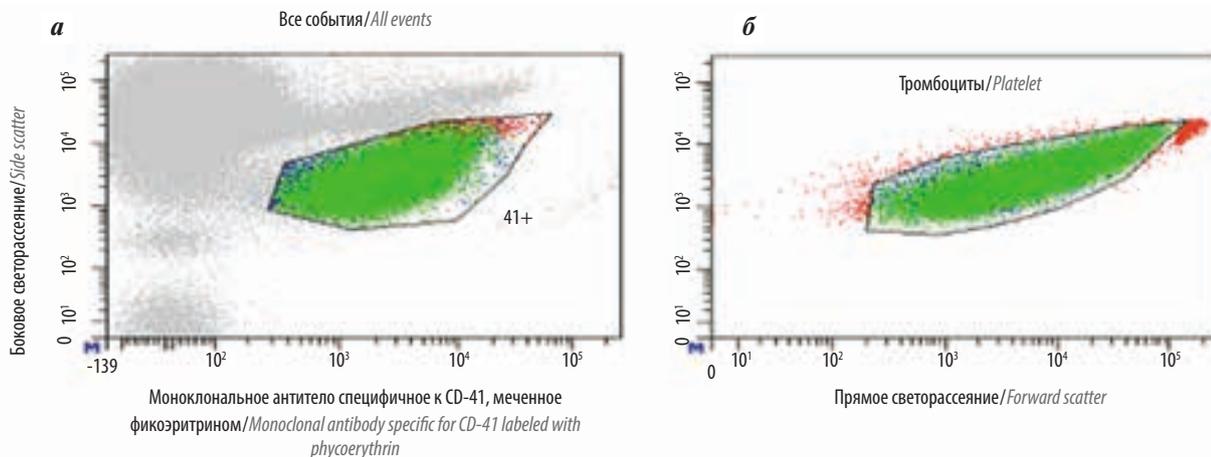


Рис. 3. Идентификация тромбоцитов: а – выделение тромбоцитов по CD41a; б – корректировка по параметрам бокового и прямого светорассеяния

Fig. 3. Platelet identification: а – platelet selection according to CD41a; б – adjustment by the side and forward light scattering parameters

и компонентов системы комплемента на мембране тромбоцитов (95 % доверительный интервал).

Определение плотности фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента у больных лиц и здоровых доноров. При исследовании обнаружено, что плотность фиксации (СИФ) PAIg (G, M, A) и СИФ PAC3/C4 была выше во всех группах больных (AA, МДС, ОМЛ) по сравнению с донорами.

Средние колебания плотности фиксации иммуноглобулинов и компонентов комплемента представлены в табл. 4. Во всех группах больных СИФ превышала достоверный пороговый уровень плотности фиксации, т.е. была выше отрицательного контроля доноров, что было статистически достоверным ($p \leq 0,001$).

Зависимость плотности фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента от пола, возраста и диагноза между группами больных и донорами. При сравнении этих показателей обнаружено значимое отличие СИФ PAIgM ($p \leq 0,0005$), PAIgA ($p \leq 0,0002$), PAC3 ($p \leq 0,001$) и PAC4

($p \leq 0,0002$) между группами больных AA, МДС, ОМЛ и донорами. Эти параметры являются статистически достоверными.

В то же время между этими группами больных и донорами по СИФ PAIgG различия были недостоверны ($p = 0,07$).

Зависимости плотности фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента от возраста и пола не обнаружено.

Взаимосвязь плотности фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента. При сравнительном анализе этих исследований обнаружена сильная корреляция значений СИФ между PAIgM и PAIgA ($r = 0,7$), между PAIgM и PAC3/C4 ($r = 0,5$), между PAIgA и PAC3/C4 ($r = 0,6$), между PAC3 и PAC4 ($r = 0,5$). Эти параметры являются статистически достоверными. Чаще встречаются сочетание иммуноглобулинов IgM + IgA, сочетание иммуноглобулинов с компонентами системы комплемента IgM + C3/C4, IgA + C3/C4 и сочетание компонентов системы комплемента C3 + C4.

Таблица 4. Средняя интенсивность флуоресценции тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента в группах больных и доноров, отн. ед.

Table 4. The mean fluorescence intensity of platelet-associated immunoglobulins and complement components in groups of patients and donors, rel. units

Тромбоцитассоциированные иммуноглобулины/компоненты системы комплемента Platelet-associated immunoglobulins/complement components	AA AA	МДС MDS	ОМЛ AML	Доноры Donors
PAIgG	552 (21–4008)	747 (108–5804)	627 (94–5166)	217 (84–709)
PAIgM	676 (80–8915)	530 (186–3442)	391 (124–3942)	182 (79–514)
PAIgA	527 (25–5016)	412 (143–2199)	616 (100–5506)	165 (74–677)
PAC3	119 (18–614)	223 (76–5434)	210 (54–2606)	47 (23–188)
PAC4	111 (88–665)	111 (88–665)	149 (96–832)	78 (43–179)

Такие сочетания могут свидетельствовать о том, что у больных, получающих множественные трансфузии тромбоцитов, дополнительным фактором, связанным с механизмом разрушения тромбоцитов, может являться антителоопосредованный и комплементзависимый цитолиз, а также фагоцитоз. В то же время известно, что IgA не фиксирует комплемент и наличие PAC3/C4 в этом случае может быть обусловлено PAIgM или IgG, которые затем диссоциировали с поверхности тромбоцитов.

Зависимость плотности фиксации PAIgA и PAC3 от количества трансфузий у больных с рефрактерностью к трансфузиям донорских тромбоцитов. При сравнении параметров высокой плотности фиксации PAIgA с числом предшествующих трансфузий тромбоцитов обнаружено достоверное увеличение плотности фиксации PAIgA с увеличением количества трансфузий КТ у рефрактерных к трансфузиям больных, статистически этот параметр достоверен ($p < 0,02$). Также отмечается тенденция увеличения плотности фиксации PAC3 с ростом числа предшествующих трансфузий тромбоцитов ($p = 0,07$).

У больных с рефрактерностью и с множественными трансфузиями ($M_e = 22$) тромбоцитов плотность фиксации PAIgA была выше по сравнению с другими PAIg. Видимо, это связано с высокой трансфузионной нагрузкой.

Зависимость плотности фиксации PAIgM от рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов. При сравнении параметров наличия или отсутствия рефрактерности установлено, что у больных с рефрактерностью к трансфузиям тромбоцитов обнаружено достоверно более высокое значение СИФ PAIgM по сравнению с больными, у которых не было рефрактерности к трансфузиям, что является статистически достоверным ($p < 0,02$). В общей группе с рефрактерностью к трансфузиям выявлено 36 случаев, превышающих порог плотности фиксации PAIgM, 28 случаев — ниже порога фиксации PAIgM. В общей группе без рефрактерности к трансфузиям выявлен 31 случай, превышающий порог плотности фиксации PAIgM, 46 случаев — ниже порога фиксации PAIgM.

Эти данные говорят о том, что на фоне рефрактерности с постоянной трансфузионной нагрузкой появляются иммуноглобулины класса M, которые могут приводить к снижению эффективности проводимой трансфузионной терапии КТ.

Зависимость плотности фиксации PAIgM, PAIgA и PAC3 от частоты реагирования аллоантител у больных с рефрактерностью к трансфузиям донорских тромбоцитов. При сравнении плотности фиксации PAIg и PAC3/C4 и частоты реагирования была выявлена зависимость СИФ PAIgA и PAC4 от высокой частоты реагирования аллоантител, что является статистически достоверным для PAIgA ($p < 0,04$), PAC4 ($p < 0,02$). Также имеется тенденция взаимосвязи наличия высокой плотности фиксации PAIgM ($p = 0,08$) и высокой

частоты реагирования. Связи с PAIgG и PAC3 не обнаружено.

Эти данные свидетельствуют о том, что у рефрактерных к трансфузиям больных дополнительно с антитромбоцитарными аллоантителами цитотоксическое действие могут проявлять PAIgM, PAIgA и PAC4, что может существенно затруднять подбор пары донор — реципиент в иммунологических тестах.

Таким образом, во всех исследованиях плотность фиксации иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента на поверхности тромбоцитов была выше порогового уровня СИФ. Высокая плотность фиксации IgM и IgA в сочетании с компонентами системы комплемента IgM + C3/C4, IgA + C3/C4, а также высокая плотность фиксации сочетания компонентов системы комплемента C3 + C4 могут свидетельствовать об иммунной аутоагрессии, что в результате приводит к антителоопосредованному и комплементзависимому цитолизу тромбоцитов у больных, получавших множественные трансфузии тромбоцитов.

Определение тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов классов G, M, A и тромбоцитассоциированных компонентов системы комплемента C3, C4 у больных апластической анемией

Группа больных АА была наиболее подробно изучена по параметрическим факторам. Всего проанализированы данные 47 больных и проведено 92 исследования на разных этапах терапии с постановкой проб PAIg по классам (G, M, A) и PAC3/C4.

Снижение значения плотности фиксации (СИФ) PAIg и PAC было выявлено в 333 случаях, повышение — в 133. Из них значения СИФ по классам иммуноглобулинов: снижение СИФ PAIgG — 66, повышение — 26; снижение СИФ PAIgM — 54, повышение — 38; снижение СИФ PAIgA — 65, повышение — 33.

Значения СИФ среди компонентов комплемента PAC3: снижение — 77, повышение — 15; PAC4: снижение — 71, повышение — 21. Таким образом, больше всего положительных значений СИФ выявляли среди PAIgM (41 %) и PAIgA (29 %).

Значения СИФ PAIgM и PAIgA у больных АА на фоне трансфузий тромбоцитов и без трансфузий тромбоцитов. При сравнении параметров было установлено, что больные, которые были зависимы от трансфузий донорских КТ, имели повышенную плотность фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента, в отличие от больных, которым не проводились трансфузии донорских КТ в течение 1 мес и более (рис. 4). Причем плотность фиксации PAIgM у трансфузионнозависимых больных была выше (648 относительных единиц) по сравнению с другими иммуноглобулинами и компонентами системы комплемента. Достоверные

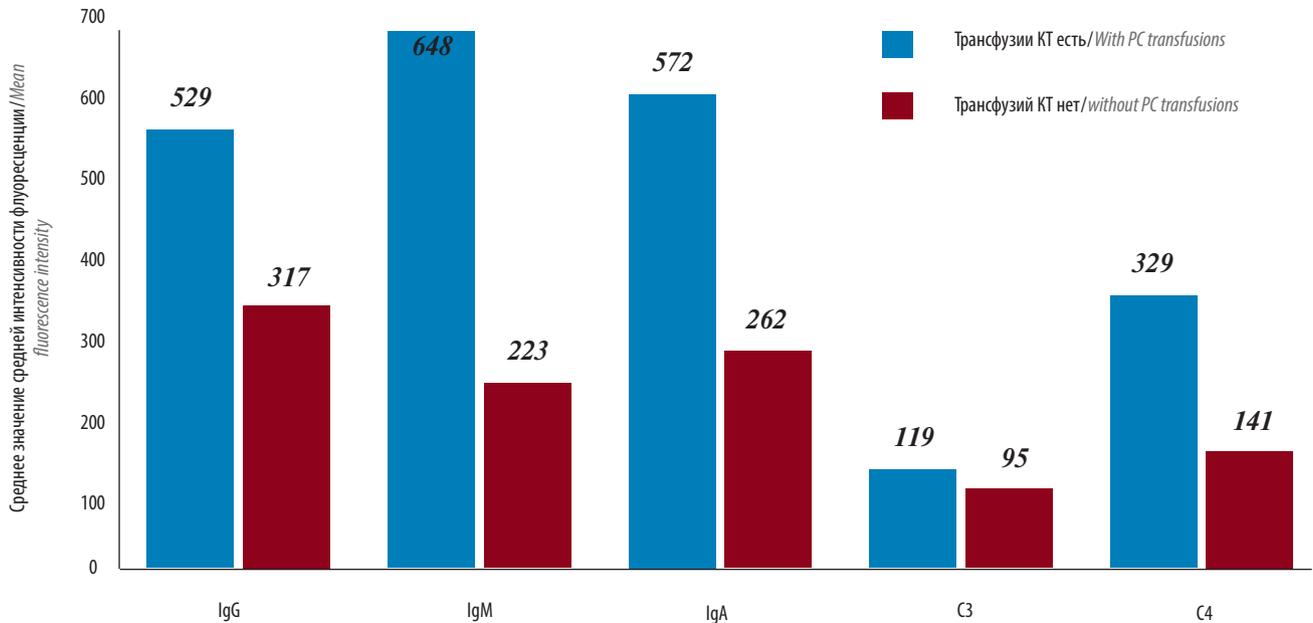


Рис. 4. Среднее значение средней интенсивности флуоресценции в группе больных апластической анемией с трансфузиями концентратов тромбоцитов (КТ) и без трансфузий

Fig. 4. The average mean fluorescence intensity value in aplastic anemia patients with and without platelet concentrate (PC) transfusions

различия наблюдались между РАIgM ($p \leq 0,009$) и РАIgA ($p \leq 0,02$).

Зависимость активности циркулирующих антитромбоцитарных аллоантител от значений СИФ РАIgM, РАIgA и PAC4 у больных АА. При сравнении параметров было установлено, что у больных с высокой активностью антитромбоцитарных аллоантител, которая обозначалась в условных единицах (Relative Units-RU), обнаружены корреляция и достоверное увеличение плотности фиксации РАIgM ($r = 0,5$; $p = 0,0001$); РАIgA ($r = 0,7$; $p = 0,0001$) и PAC4 ($r = 0,6$; $p = 0,0001$). Зависимости между активностью антитромбоцитарных аллоантител и РАIgG и PAC3 не обнаружено (рис. 5).

Таким образом, у больных с высокой активностью антитромбоцитарных аллоантител дополнительно обнаруживается высокая плотность фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента, в отличие от больных с низкой активностью антитромбоцитарных аллоантител, что в последующем может затруднять подбор совместимой пары донор – реципиент.

Зависимость рефрактерности к трансфузиям от количества трансфузий тромбоцитов в анамнезе. При сравнении параметров было установлено, что больные с рефрактерностью к трансфузиям донорских тромбоцитов в анамнезе имели большее количество трансфузии тромбоцитов ($M = 35$ (3–141)), чем больные без рефрактерности ($M = 15$ (0–82)), что является статистически достоверным ($p = 0,0018$).

Зависимость плотности фиксации РАIgM и PAC3/C4 от клинического статуса. При исследовании зависимости между РАIg, PAC и клиническим статусом у больных

АА обнаружено, что СИФ PAC3 была выше у больных при рецидиве заболевания (рис. 6), что является статистически достоверным ($p = 0,0485$). Имеется также тенденция повышения при рецидиве СИФ РАIgM ($p = 0,0567$) и СИФ PAC4 ($p = 0,0562$).

Зависимость плотности фиксации РАIgM и РАIgA от наличия инфекционных осложнений. При исследовании обнаружено, что у больных с множественными инфекционными осложнениями отмечается высокая плотность фиксации РАIgM и РАIgA, что является статистически достоверным ($p = 0,0062$, $p = 0,0022$ соответственно). В то же время связь PAC3 с инфекционными осложнениями у больных АА была недостоверна ($p = 0,0975$).

Инфекционные осложнения всегда сопровождаются большим выбросом провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, стимулируют образование иммуноглобулинов (IgM, IgA).

Зависимость плотности фиксации РАIgM и РАIgA от наличия предшествующих трансфузий за последние 3 мес. При исследовании обнаружено, что у больных, которым проводили трансфузии тромбоцитов в последние 3 мес, отмечается высокая плотность фиксации РАIgM/A, в отличие от больных, которым не проводили трансфузии тромбоцитов в последние 3 мес. Статистически параметры являются достоверными для СИФ РАIgM ($p = 0,0033$) и СИФ РАIgA ($p = 0,0461$).

У больных с множественными трансфузиями первыми выявляются РАIgM, которые могут приводить в дальнейшем к неэффективным трансфузиям тромбоцитов.

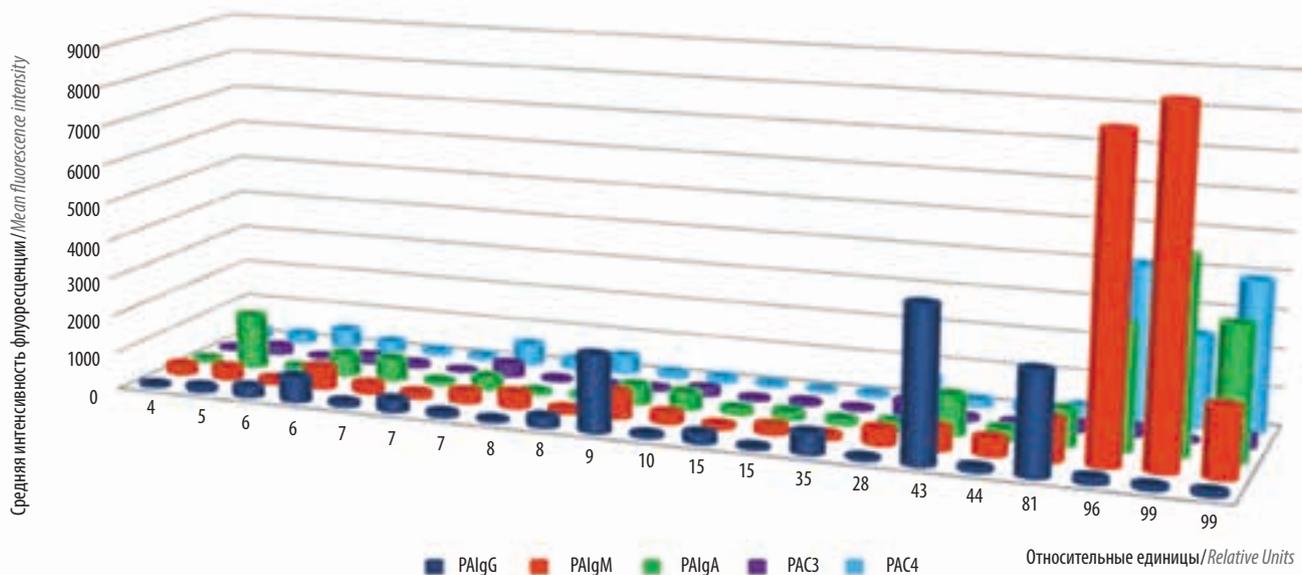


Рис. 5. Зависимость среднего значения активности антитромбоцитарных аллоантител от значений средней интенсивности флуоресценции PAIg/PAC у больных апластической анемией

Fig. 5. The dependence of the mean activity of antiplatelet alloantibodies from mean fluorescence intensity of PAIg / PAC in aplastic anemia patients

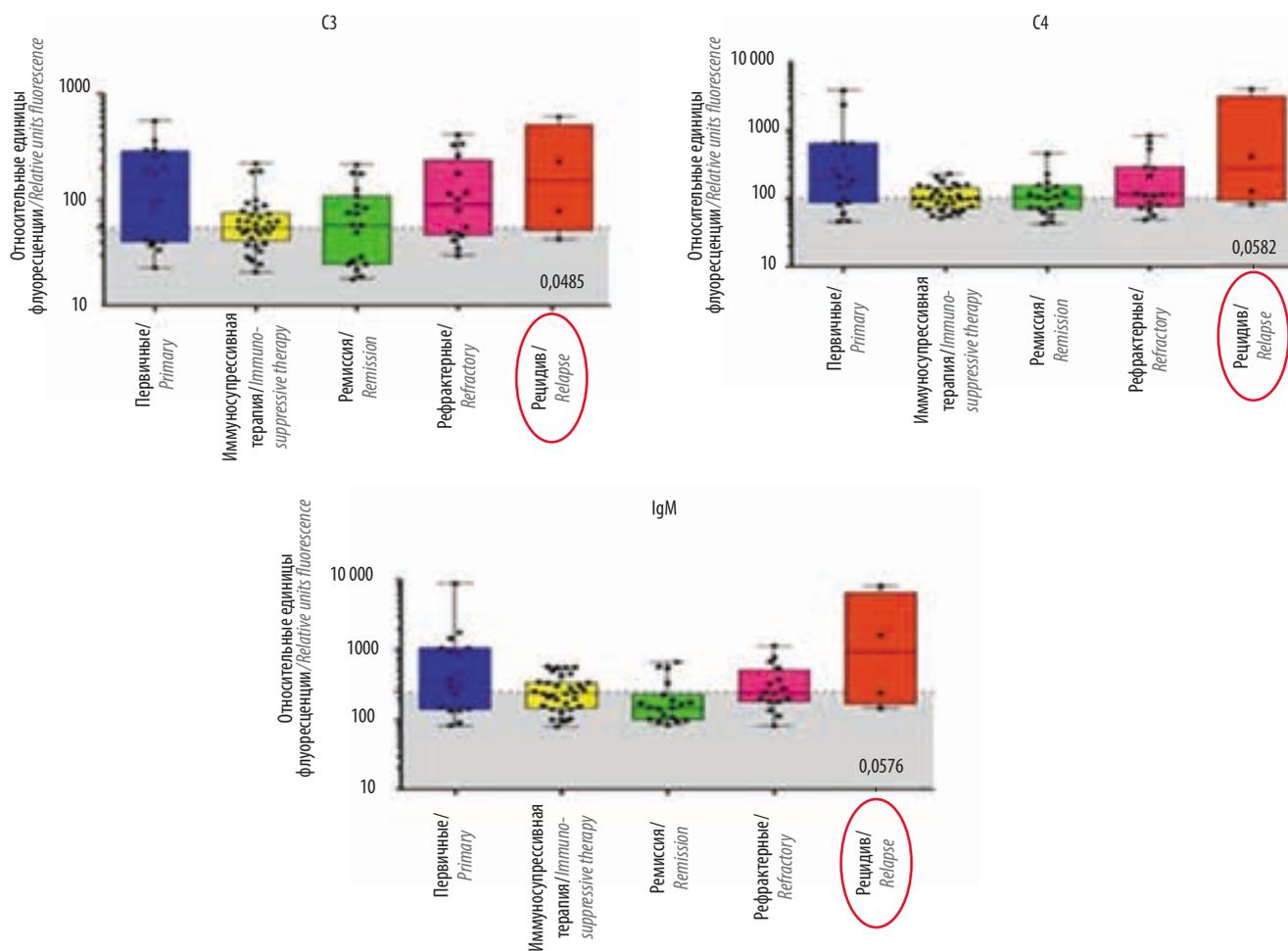


Рис. 6. Значения средней интенсивности флуоресценции тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента в зависимости от степени тяжести заболевания и клинического статуса

Fig. 6. Mean fluorescence intensity values of platelet-associated immunoglobulins and complement components, depending on the disease severity and clinical status

Зависимость плотности фиксации PAIgM от рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов. При исследовании обнаружено, что у больных с высокой частотой реагирования аллоантител и рефрактерностью к трансфузиям тромбоцитов отмечалась высокая плотность фиксации и PAIgM, в отличие от больных без рефрактерности, что является статистически достоверным ($p = 0,0428$). Появление PAIgM может способствовать в дальнейшем неэффективным трансфузиям донорских тромбоцитов.

Обсуждение

У гематологических больных с зависимостью от трансфузий донорских тромбоцитов в течение длительного времени, а также при развитии аллоиммунизации с последующей рефрактерностью к трансфузиям появляются как аллоиммунные антитромбоцитарные антитела, так и тромбоцитассоциированные иммуноглобулины и тромбоцитассоциированные компоненты системы комплемента. Детекцию тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента проводили с помощью двойного окрашивания в реакции прямой поверхностной иммунофлуоресценции методом проточной цитофлуориметрии. Появление PAIg/PAC3/C4 может быть связано как с общей воспалительной реакцией, выбросом провоспалительных цитокинов и активацией тромбоцитов, так и с развитием аутоиммунных процессов в отношении собственных тромбоцитов. Эти процессы разрушают тромбоциты, что усугубляет развитие тромбоцитопении. У больных с высокой активностью антитромбоцитарных аллоантител дополнительно обнаруживается высокая плотность фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента, в отличие от больных с низкой активностью антитромбоцитарных аллоантител. Это может свидетельствовать о возможной циркуляции иммуноглобулинов в виде циркулирующих иммунных комплексов в плазме больного, что в последующем может влиять на иммунологическую реакцию индивидуального донора пары донор – реципиент.

По данным опубликованных работ [8, 12–14, 17, 18], исследование плотности фиксации тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента у больных с иммунной формой тромбоцитопении (иммунная тромбоцитопения, вторичные тромбоцитопении) и с неиммунной формой (цирроз печени, сепсис, спленомегалия, острые лейкозы) чаще всего проводят методом проточной цитофлуориметрии. Как свидетельствуют данные зарубежных авторов, IgG встречаются чаще при иммунных формах тромбоцитопений – в 66 % случаев (причем при иммунной тромбоцитопении – в 50 % случаев), при неиммунных – в 10 %. Другие классы IgM, IgA и PAC3 детектируются практически

одинаково как при иммунных, так и при неиммунных формах тромбоцитопении. При инфекциях и сепсисе чаще выявляются на тромбоцитах IgG в сочетании с PAC3. Высокая плотность PAIgG, PAC3 и PAIgG в изолированной форме наблюдается при гепатитах и циррозах печени. Наличие высокой плотности тромбоцитассоциированных PAIgG/M может активировать компонент системы комплемента C3. Фиксация компонента системы комплемента C3 происходит в присутствии иммуноглобулинов. Сочетание PAIgG/M встречается в 90 % случаев как при иммунных, так и при неиммунных формах тромбоцитопений. Изолированная высокая плотность PAIgM встречается при синдроме Эванса. PAIgG/M, особенно PAIgM, обладают комплементсвязывающей способностью. Опубликованных работ, связанных с определением тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов классов G, M, A и компонентов системы комплемента C3, C4, а также с определением их значения и взаимосвязи с клиническими особенностями течения заболевания у больных АА не найдено.

В нашем исследовании у больных АА и гемобластомами выявляется высокая частота фиксации на поверхности тромбоцитов PAIgM и PAIgA, а также сочетания PAIgM/A, PAIgM/C3/C4 и PAIgA/C3/C4. Высокая плотность фиксации иммуноглобулинов и компонентов системы комплемента, как правило, приводит к антителопосредованному и комплементзависимому цитолизу с последующим фагоцитозом тромбоцитов клетками ретикулоэндотелиальной системы в селезенке и печени. Постоянная трансфузионная нагрузка сопровождается появлением PAIgA и PAC3, а при развитии аллоиммунизации и рефрактерности к трансфузиям появляются также PAIgM и PAC4, которые приводят в дальнейшем к неэффективным трансфузиям тромбоцитов. Фиксируясь на тромбоцитах больного, эти иммуноглобулины в сочетании с компонентами системы комплемента C3/C4 могут затем отщепляться от поверхности, циркулировать в периферической крови в составе иммунных комплексов, что усугубляет течение рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов. У аллоиммунизированных больных тромбоцитассоциированные иммуноглобулины могут реагировать со специфическими антитромбоцитарными аллоантителами в иммунологических тестах и снижать вероятность подбора совместимых пар донор – реципиент, поэтому выявление PAIg желательно осуществлять заблаговременно. Также нами отмечено, что у рефрактерных к трансфузиям больных АА с высокой степенью аллоиммунизации обнаруживается высокая плотность PAIgM ($p = 0,0428$), способствующая повышенному разрушению тромбоцитов, в том числе и донорских. Множественные инфекционные осложнения и высокая трансфузионная нагрузка донорскими тромбоцитами у больных АА приводят к появлению тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов. Инфекционные осложнения всегда сопровождаются

большим выбросом провоспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, стимулируют образование иммуноглобулинов (IgM, IgA). При рецидиве АА выявляется высокая плотность фиксации РАС3 ($p = 0,0485$), РАС4 ($p = 0,0562$) и РАИгМ ($p = 0,0567$). Рецидив АА – прогрессирование заболевания, обусловленное появлением активированных субклонов Т-лимфоцитов, что приводит к выбросу большого количества провоспалительных цитокинов (TNF α , IFN γ , IL-2, IL-6, IL-8), подавляющих пролиферацию клеток ранних предшественников кроветворения и усиливающих апоптоз гемопоэтических стволовых клеток, что приводит к развитию цитопении, появлению зависимости от трансфузий компонентами донорской крови.

Многочисленные трансфузии КТ часто приводят к развитию аллоиммунизации донорскими аллоантигенами тромбоцитов с образованием полиспецифических аллоантител, что в дальнейшем сводит к нулю вероятность подбора пар донор – реципиент и усугубляет течение рефрактерности к трансфузиям, приводя к некупируемым геморрагическим осложнениям. Относительно высокая частота обнаружения РАИгМ, РАИгА и РАС3/С4 у больных АА с множественными трансфузиями КТ в нашем исследовании может свидетельствовать об иммунологической атаке тромбоцитов и донора, а также реципиента в результате аутоиммунных процессов и сверхактивации и апоптоза тромбоцитов под действием провоспалительных цитокинов как следствие множественных трансфузий у гематологических больных с данными заболеваниями.

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований обнаружено, что у больных АА и

гемобластозами при развитии рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов чаще выявляется повышенная плотность фиксации IgM, IgA и компонентов системы комплемента С3, С4 на мембране тромбоцитов.

Установлено, что на фоне постоянной трансфузионной нагрузки с развитием аллоиммунизации и рефрактерности к трансфузиям КТ, а также при множественных инфекционных осложнениях и особенностях течения АА появляются тромбоцитассоциированные IgM, IgA и тромбоцитассоциированные компоненты системы комплемента С3, С4.

Эти факты свидетельствуют о том, что у больных АА и гемобластозами с длительным трансфузионным анамнезом и высоким риском развития рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов необходимо заблаговременно осуществлять детекцию тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов (классов G, M, A) и тромбоцитассоциированных компонентов системы комплемента (С3, С4). При развитии рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов помимо применения определенного алгоритма трансфузионной терапии с использованием индивидуального подбора и лечебного плазмафереза также необходимо проводить детекцию тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов (классов G, M, A) и компонентов системы комплемента (С3, С4) в динамике.

Следует подчеркнуть, что наличие тромбоцитассоциированных иммуноглобулинов (классов G, M, A) и тромбоцитассоциированных компонентов системы комплемента (С3, С4) снижает эффективность индивидуального подбора пар донор – реципиент, тем самым усугубляет развитие рефрактерности к трансфузиям донорских тромбоцитов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Савченко В.Г. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови в 2 томах. М.: Практика, 2018. С. 1006–1255. [Savchenko V.G. Diagnostic algorithms and treatment protocols for blood diseases. Moscow: Praktika, 2018. Pp. 1006–1255. (In Russ.)].
2. Corazza M. Hnanchook M. Massive blood transfusion therapy. AANA J 2000;68(4):311–4.
3. Fletcher C.H., DomBourian M.G., Millward P.A. Platelet transfusion for patients with cancer. Cancer Control 2015;22(1):47–51. DOI: 10.1177/107327481502200107.
4. Зотиков Е.А., Бабаева А.Г., Головкина Л.Л. Тромбоциты и антиромбоцитарные антитела. М.: Монолит, 2003. 125 с. [Zotikov E.A., Babaeva A.G., Golovkina L.L. Platelets and antiplatelet antibodies. Moscow: Monolit, 2003. 125 p. (In Russ.)].
5. Рахмани А.Ф., Михайлова Е.А., Дубинкин И.В. и др. Рефрактерность к трансфузиям донорских тромбоцитов у больных апластической анемией и гемобластомами. Онкогематология 2018;13(2):62–72. DOI: 10.17650/1818-8346-2018-13-2-62-72. [Rakhmani A.F., Mikhailova E.A., Dubinkin I.V. et al. Refractoriness to donor platelets transfusion in patients with aplastic anemia and hemoblastosis. Onkogematologiya = Oncohematology 2018;13(2):62–72. (In Russ.)].
6. Hod E., Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. Br J Haematol 2008;142(3):348–60. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07189.x.
7. Forest S.K., Hod E.A. Management of the platelet refractory patient. Hematol Oncol Clin North Am 2016;30(3):665–77. DOI: 10.1016/j.hoc.2016.01.008.
8. Kiefel V., Konig C., Kroll H., Santoso S. Platelet alloantibodies in transfused patients. Transfusion 2001;41(6):766–70. DOI:10.1046/j.1537-2995.2001.41060766.x.
9. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011. 456 с. [Mazurov A.V. Platelet physiology and pathology. Moscow: Litterra, 2011. 456 p. (In Russ.)].
10. Wallington T. Essential immunology for transfusion medicine. In: Practical Transfusion Medicine, 3rd edn. Eds.: M.F. Murphy, D.H. Pamphilon. Blackwell

- Publishing Ltd, 2009.
DOI: 10.1002/9781444311761.ch2.
11. Sayyadi M., Shaiega M., Zarif M. et al. Platelet transfusion outcome and flow cytometric monocyte phagocytic assay (FMPA). *Arch Iran Med* 2016;19(6):426–9. DOI: 0161906/AIM.0010.
 12. He Y., Zhao Y.X., Zhu M.Q. et al. Detection of autoantibodies against platelet glycoproteins in patients with immune thrombocytopenic purpura by flow cytometric immunobead array. *Clin Chim Acta* 2013;415:176–80. DOI: 10.1016/j.cca.2012.10.035.
 13. Huh H.J., Park C.J., Kim S.W. et al. Flow cytometric detection of platelet-associated immunoglobulin in patients with immune thrombocytopenic purpura and nonimmune thrombocytopenia. *Ann Clin Lab Sci* 2009;39(3):283–8.
 14. Romero-Guzmán L.T., López-Karpovitch X., Paredes R. et al. Detection of platelet-associated immunoglobulins by flow cytometry for the diagnosis of immune thrombocytopenia: a prospective study and critical review. *Haematologica* 2000;85(6):627–31.
 15. Peerschke E.I., Yin W., Ghebrehiwet B. Platelet mediated complement activation. *Adv Exp Med Biol* 2008;632:81–91. DOI: 10.1007/978-0-387-78952-1_7.
 16. Kiefel V., Freitag E., Kroll H., Santos S. et al. Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Ann Hematol* 1996;72(4):280–5.
 17. Myers T., Kim B., Steiner M., Baldini M. Platelet-associated complement C3 in immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1982;59(5):1023–8.
 18. Panzer S., Szamait S., Bödeker R.H. et al. Platelet-associated immunoglobulins IgG, IgM, IgA and complement C3 in immune and nonimmune thrombocytopenic disorders. *Am J Hematol* 1986;23(2):89–99. DOI: 10.1002/ajh.2830230203.
 19. Andrews R.K., Gardiner E.E. Basic mechanisms of platelet receptor shedding. *Platelets* 2017;28(4):319–24. DOI: 10.1080/09537104.2016.1235690.
 20. Bender M., Stegner D., Nieswandt B. Model systems for platelet receptor shedding. *Platelets* 2017;28(4):325–32. DOI: 10.1080/09537104.2016.1195491.
 21. Gardiner E.E., Al-Tamimi M., Andrews R.K., Berndt M.C. Platelet receptor shedding. *Methods Mol Biol* 2012;788:321–39. DOI: 10.1007/978-1-61779-307-3_22.
 22. Manis J.P., Silberstein L.E. Platelet refractoriness: It's not the B-all and end-all. *Blood* 2016;127(14):1740–1. DOI: 10.1182/blood-2016-02-695437.
 23. Михайлова Е.А. Программное лечение больных апластической анемией. В кн.: В.Г. Савченко, Е.А. Михайлова, Е.Н. Устинова, Г.А. Клясова. Программное лечение лейкозов. М.: Практика, 2018. С. 328–342. [Mikhailova E.A. Program treatment of aplastic anemia patients. In: V.G. Savchenko, E.A. Mikhailova, E.N. Ustinova, G.A. Klyasova. Program treatment of leukemia. Moscow: Praktika, 2018. Pp. 328–342. (In Russ.)].
 24. Killick S., Bown N., Cavenagh J. et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2016;172(2):187–207. DOI: 10.1111/bjh.13853.
 25. Bevans M.F., Shalabi R.A. Management of patients receiving antithymocyte globulin for aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Clin J Oncol Nurs* 2004;8(4):377–82. DOI: 10.1188/04.CJON.377-382.
 26. Cheson B.D., Bennett J.M., Kopecky K.J. et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21(24):4642–9. DOI: 10.1200/JCO.2004.99.116.
 27. Carubbi C., Masselli E., Gesi M. et al. Cytofluorimetric platelet analysis. *Semin Thromb Hemost* 2014;40(1):88–98. DOI: 10.1055/s-0033-1363472.
 28. Sarkar R.S., Philip J., Jain N. Detection and identification of platelet-associated alloantibodies by a solid-phase modified antigen capture elisa (MACE) technique and its correlation to platelet refractoriness in multi platelet concentrate transfused patients. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2015;31(1):77–84. DOI: 10.1007/s12288-014-0374-4.

Вклад авторов

А.Ф. Рахмани: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 Е.А. Михайлова: выборка больных для исследования, редактирование текста рукописи;
 И.В. Гальцева, Ю.О. Давыдова, Н.М. Капранов: проведение цитометрического анализа, получение лабораторных данных для исследования;
 И.В. Дубинкин: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи;
 С.М. Куликов: анализ полученных данных (включая статистический);
 Т.В. Гапонова: редактирование текста рукописи;
 З.Т. Фидарова, В.В. Троицкая: выборка больных для исследования;
 Е.Н. Паровичникова, В.Г. Савченко: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

A.F. Rakhmani: study design development, reviewing of publications on the article's topic, article writing;
 E.A. Mikhaylova: a sample of patients for the study, article editing;
 I.V. Galtseva, Yu.O. Davidova, N.M. Kapranov: cytometric analysis, obtaining laboratory data for study;
 I.V. Dubinkin: study design development, article editing;
 S.M. Kulikov: analysis of the data (including statistical);
 T.V. Gaponova: article editing;
 Z.T. Fidarova, V.V. Troitskaya: a sample of patients for the study;
 E.N. Parovichnikova, V.G. Savchenko: reviewing of publications on the article's topic.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Ф. Рахмани/A.F. Rakhmani: <http://orcid.org/0000-0002-1568-0999>
 Е.А. Михайлова/E.A. Mikhaylova: <http://orcid.org/0000-0002-2449-2682>
 И.В. Гальцева/I.V. Galtseva: <https://orcid.org/0000-0002-8490-6066>
 И.В. Дубинкин/I.V. Dubinkin: <http://orcid.org/0000-0001-5347-0127>
 Т.В. Гапонова/T.V. Gaponova: <https://orcid.org/0000-0002-9684-5045>
 З.Т. Фидарова/Z.T. Fidarova: <https://orcid.org/0000-0003-0934-6094>

В.В. Троицкая/V.V. Troitskaya: <https://orcid.org/0000-0002-4827-8947>
Е.Н. Паровичникова/E.N. Parovichnikova: <https://orcid.org/0000-0001-6177-3566>
В.Г. Савченко/V.G. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0001-8188-5557>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.
Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.