

ШУСТОВА ОЛЬГА НИКОЛАЕВНА

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ И ПРЕДИКТОРЫ НЕОНАТАЛЬНОЙ
ИММУННОЙ ТРОМБОЦИТОПЕНИИ**

14.03.10 «Клиническая лабораторная диагностика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Мазуров Алексей Владимирович доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Годков Михаил Андреевич доктор медицинских наук, заведующий научным отделом лабораторной диагностики Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы "Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского департамента здравоохранения города Москвы".

Петров Виктор Юрьевич доктор медицинских наук, врач-гематолог, гематологического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы "Морозовская детская городская клиническая больница департамента здравоохранения города Москвы".

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022г. В ____, на заседании диссертационного совета Д 208.073.05 по присуждению ученой степени кандидата медицинских наук Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России (121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15А) и на сайте <http://cardioweb.ru>.

Автореферат разослан « __ » _____ 2021г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Ускач Татьяна Марковна

Введение. Актуальность проблемы. Тромбоцитопения – наиболее частая причина повышенной кровоточивости у взрослых и детей. Уровень тромбоцитов варьирует в зависимости от возраста и пола, и имеет широкий референсный интервал ($150 \times 10^9/\text{л}$ – $450 \times 10^9/\text{л}$). Формально снижение количества тромбоцитов ниже $150 \times 10^9/\text{л}$ можно трактовать как тромбоцитопению, но реальное обследование больных начинается при содержании тромбоцитов ниже $100 \times 10^9/\text{л}$. Геморрагические осложнения обычно развиваются при более глубокой тромбоцитопении (менее $50 \times 10^9/\text{л}$). [Psaila B. et al., 2013, Хаспекова С.Г. и др., 2019]. Неонатальная тромбоцитопения диагностируется у 1–5% новорожденных, бывает иммунного и не иммунного генеза и является значимой клинической проблемой в связи с возможным развитием опасных геморрагических осложнений. Иммунная неонатальная тромбоцитопения – это результат разрушения тромбоцитов плода под действием антитромбоцитарных ауто- или аллоантител (IgG типа), вырабатываемых организмом матери и проникающих в кровоток плода через плацентарный барьер, начиная со второго триместра беременности [Roberts I. et al., 2003, 2013]. У плода развивается тромбоцитопения, сохраняющаяся в течение нескольких недель после родов у новорожденного. Это состояние опасно развитием геморрагического синдрома. По механизму возникновения антитромбоцитарных антител выделяют две группы неонатальных иммунных тромбоцитопений: неонатальная трансиммунная (аутоиммунная) тромбоцитопения (НТИТ) и неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения (НАИТ) [Roberts I. et al., 2013, Хаспекова С.Г. и др., 2019].

НТИТ диагностируется у части новорожденных от матерей с иммунной тромбоцитопенией (ИТП). ИТП – классическое аутоиммунное заболевание, характеризующееся выработкой аутоантител против собственных тромбоцитов. Частота ИТП у беременных женщин составляет 1–2 случая на 1000 беременностей. НТИТ развивается у 30–40% новорожденных от матерей с ИТП в результате воздействия аутоантител матери на тромбоциты плода/новорожденного. У 1–2% новорожденных с НТИТ диагностируются внутричерепные кровоизлияния разной степени тяжести. Диагностика НТИТ у новорожденного от матери с ИТП после родов не вызывает затруднений. Гораздо более важным является возможность прогнозировать развитие НТИТ у плода от матери с ИТП во время беременности. [Koyama S. et al., 2012, Roberts I. et al., 2013]. На настоящий момент данные о возможных предикторах НТИТ недостаточны и противоречивы.

НАИТ развивается у плода под действием аллоантител, которые вырабатывает организм матери против аллоантигенов, представленных на тромбоцитах плода/отца, но отсутствующих на тромбоцитах самой матери. Частота НАИТ составляет 1 случай на 2000–3000 родов. НАИТ может развиваться как при первой, так и при последующих беременностях, может не диагностироваться при умеренной выраженности у новорожденного, а может сопровождаться тяжелыми осложнениями, в том числе внутричерепными кровоизлияниями, частота которых достигает 15–20% [Bussel J. et al., 2008, Zdravic D. et al., 2016]. НАИТ – результат несовместимости матери и ребенка по аллоантигенам системы НРА (Human Platelet Alloantigens, аллоантигены тромбоцитов человека). Большая часть этих аллоантигенов локализована в мембранных гликопротеинах (ГП) поверхности тромбоцитов – ГП IIb–IIIa (CD61/CD41), ГП Ib (CD42b), ГП Ia (CD49b), CD109. В Европейских популяциях иммунный конфликт при НАИТ в 70–80 % случаев обусловлен выработкой матерью, гомозиготной по редкому НРА1b аллоантигену, антител против НРА1a аллоантигена плода, но в азиатских популяциях чаще встречаются конфликты по другим аллоантигенам. [Kaplan C. et al., 2013]. Природа аллоиммунных конфликтов при НАИТ в российской популяции остается неизученной.

Цель работы: поиск диагностических маркеров и предикторов различных форм неонатальной иммунной тромбоцитопении.

Задачи исследования:

1. Определение факторов риска развития НТИТ у новорожденных от матерей с иммунной тромбоцитопенией (ИТП).
2. Характеристика циркулирующих антитромбоцитарных аутоантител у беременных женщин с ИТП, как предиктора НТИТ.
3. Характеристика циркулирующих в крови матерей аллоантител, реагирующих с тромбоцитами отца, как маркера НАИТ.
4. Выявление особенностей иммунологических конфликтов по НРА аллоантигенам матери и ребенка, являющихся причиной НАИТ в российской популяции.
5. Разработка алгоритма дифференциальной диагностики неонатальных иммунных тромбоцитопений.

Научная новизна. При изучении НТИТ впервые получены следующие данные:

- 1) Циркулирующие антитела (цАТ), выявляемые в крови матери с ИТП по реакции с тромбоцитами донора, являются надежными предикторами развития НТИТ.
- 2) Выявлена

прямая взаимосвязь между количеством цАТ у матерей с ИТП и глубиной тромбоцитопении у детей. При изучении НАИТ получены следующие данные: 1) цАТ выявляемые у матери с нормальным количеством тромбоцитов по реакции с тромбоцитами отца, но не реагирующие с тромбоцитами матери, являются диагностическим маркером НАИТ; 2) главной причиной развития НАИТ в российской популяции являются конфликты по НРА-1 аллоантигенам, которые составляют 70% всех случаев НАИТ, с одинаковой частотой выработки аллоантител против НРА1а и 1b аллоантигенов, а второе место по частоте занимают конфликты по НРА-15 аллоантигенам – 22%.

Научно-практическое значение. Для улучшения прогнозирования и диагностики неонатальной иммунной тромбоцитопении предложено выполнение следующих лабораторных анализов. Матерям с ИТП для определения риска развития НТИТ у ребенка рекомендовано определять в крови наличие и титр цАТ, реагирующих с тромбоцитами доноров. При рождении ребенка с тромбоцитопенией неясного генеза у матери с нормальным количеством тромбоцитов и особенно при наличии в анамнезе выкидышей и новорожденных с низким количеством тромбоцитов, для диагностики НАИТ рекомендовано определять в крови матери цАТ, реагирующие с тромбоцитами отца ребенка (но не реагирующие с тромбоцитами матери). Разработан и апробирован высокочувствительный метод иммуноферментного анализа (ИФА) для определения антитромбоцитарных цАТ, по их реакции с нефиксированными, адгезированными на пластике тромбоцитами донора (диагностика НТИТ) или отца ребенка (диагностика НАИТ). Предложен алгоритм дифференциальной диагностики неонатальных иммунных тромбоцитопений.

Положения, выносимые на защиту. 1. Наличие у матерей с ИТП циркулирующих антитромбоцитарных аутоантител, является предиктором развития неонатальной трансиммунной тромбоцитопении у новорожденных. 2. Степень тяжести тромбоцитопении у новорожденных от матерей с ИТП зависит от уровня циркулирующих антитромбоцитарных аутоантител в крови матери. 3. Наличие у матери с нормальным содержанием тромбоцитов циркулирующих аллоантител, реагирующих с тромбоцитами отца и не реагирующих с тромбоцитами матери, является маркером неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении у ребенка. 4. Главными причинами неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении в российской популяции являются конфликты по НРА-

1 аллоантигенам – 70% с одинаковой частотой по НРА-1a и НРА-1b аллоантигенам и конфликты по НРА-15 аллоантигенам – 22%. 5. Разработанный алгоритм дифференциальной диагностики неонатальных иммунных тромбоцитопений с использованием методов определения антитромбоцитарных антител у матери и ребенка.

Внедрение результатов в практику: лабораторные иммунологические методы для диагностики и прогноза неонатальных тромбоцитопений внедрены и используются в лаборатории клеточной адгезии НИИЭК ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России. 121552, г. Москва, ул. 3-Черепковская 15а.

Апробация результатов. Апробация диссертационной работы состоялась на заседании межинститутского семинара ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России 24 сентября 2021 года (протокол №1). Диссертация рекомендована к защите.

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 9 научных работ: 5 статей в журналах из списка ВАК, включая 2 статьи в журналах Q1 квартиля, и 4 тезиса докладов. Основные положения диссертации доложены на нескольких российских и зарубежных конгрессах.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 111 страницах, состоит из введения, шести глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, клинические рекомендации), выводов и библиографического указателя, включающего 127 источников. Работа содержит 14 таблиц и 11 рисунков.

Личный вклад автора: автор разработала дизайн исследования, анализировала литературу, проводила исследования с использованием методов иммунохимии (определение антитромбоцитарных ауто- и аллоантител и гликокалицина) и специальных методов, применяемых для работы с тромбоцитами, вносила данные в базу, анализировала полученные результаты.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы.

Объем исследования и критерии включения пациентов. Все беременные женщины и новорожденные, включенные в исследование, наблюдались в ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ» и ГБУЗ «Измайловская ДГКБ ДЗМ». Исследование было одобрено этическими комитетами соответствующих клиник. Информированные согласия было получено от всех участников.

Неонатальная трансиммунная тромбоцитопения (НТИТ). В исследование были включены 100 беременных женщин с диагнозом ИТП, установленным по следующим критериям: 1) количество тромбоцитов $<100 \times 10^9/\text{л}$; 2) отсутствие других, неиммунных причин тромбоцитопении; 3) повышение уровня тромбоцитассоциированных IgG (ТА-IgG). После родов у части новорожденных была диагностирована неонатальная тромбоцитопения (нТП) с количеством тромбоцитов сразу после родов $<100 \times 10^9/\text{л}$.

Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения (НАИТ). В исследование было включено 27 семей, в которых родители относили себя к русским или к другим европейским популяциям России. У детей, родившихся в этих семьях, диагностировали НАИТ по следующим критериям: 1) тромбоцитопения у новорожденного; 2) отсутствие тромбоцитопении у матери; 3) отсутствие иных причин возникновения нТП, в том числе ИТП, 4) наличие у матери цАТ, направленных против тромбоцитов отца и не реагирующих с тромбоцитами матери.

Лабораторные методы. Отбор крови у детей и взрослых осуществлялся в соответствии со стандартизированными методиками. Кровь собирали без антикоагулянта (сыворотка) и с антикоагулянтами: ЭДТА 5% (150 мМ), цитрат натрия 3,8% (129 мМ), кислый цитрат - декстроза (КЦД) 1,25% (65 мМ цитрата, 85 мМ цитрата натрия. 2% декстрозы (D-глюкозы)).

Количество и средний объем тромбоцитов (СОТ) определяли в гематологическом анализаторе Abacus Junior B (Diatron Ltd., Austria), используя кровь, взятую в ЭДТА (5% (150 мМ)).

Методы, использованные для исследования ауто- и аллоантител против тромбоцитов, представлены на Рис. 1. Тромбоцит-ассоциированные иммуноглобулины (ТА-IgG) определяли по связыванию с отмытыми тромбоцитами ^{125}I меченых антител козы против IgG человека, как описано ранее [Khaspekova S.G. et al., 2015,]. ТА-IgG считали повышенными при уровне более 200% от контрольных значений у здоровых доноров. Циркулирующие (сывороточные) антитела (цАТ) в сыворотке матери определяли с помощью самостоятельно разработанного ИФА с использованием в качестве мишени нефиксированных, адгезированных на пластике тромбоцитов донора (НТИТ) или отца ребенка (НАИТ), как описано ранее [Хаспекова С.Г. и др., 2018, Khaspekova S.G. et al., 2019]. Тест МАИРА (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens, иммобилизованные с помощью моноклональных антител антигены тромбоцитов) использовали для

идентификации антигенов цАТ матерей при исследовании НТИТ и для выявления аллоантигенных мишеней в ГП IIIa (HPA1a и 1b) при исследовании НАИТ. Мажорные мембранные ГП IIb-IIIa и ГП Ib иммобилизовали из лизата тромбоцитов, на сорбированные на пластике моноклональные АТ (моноАТ) – CRC64 и VM16d соответственно, и исследовали связывание с ГП ауто- и аллоантител из сывороток пациентов [Khaspekova S.G. et al., 2019]. Плазменный гликокалицин – фрагмент тромбоцитарного ГП Ib, отщепляющегося от тромбоцитов при их разрушении и является маркером их оборота, определяли методом ИФА, разработанным в лаборатории клеточной адгезии НМИЦ кардиологии [Semenova M.M. et al., 1999].

Генотипирование HPA аллоантигенов проводили с помощью ПЦР, используя коммерческие наборы (BAG-gene HPA-TYPE (IMMUCOR)).

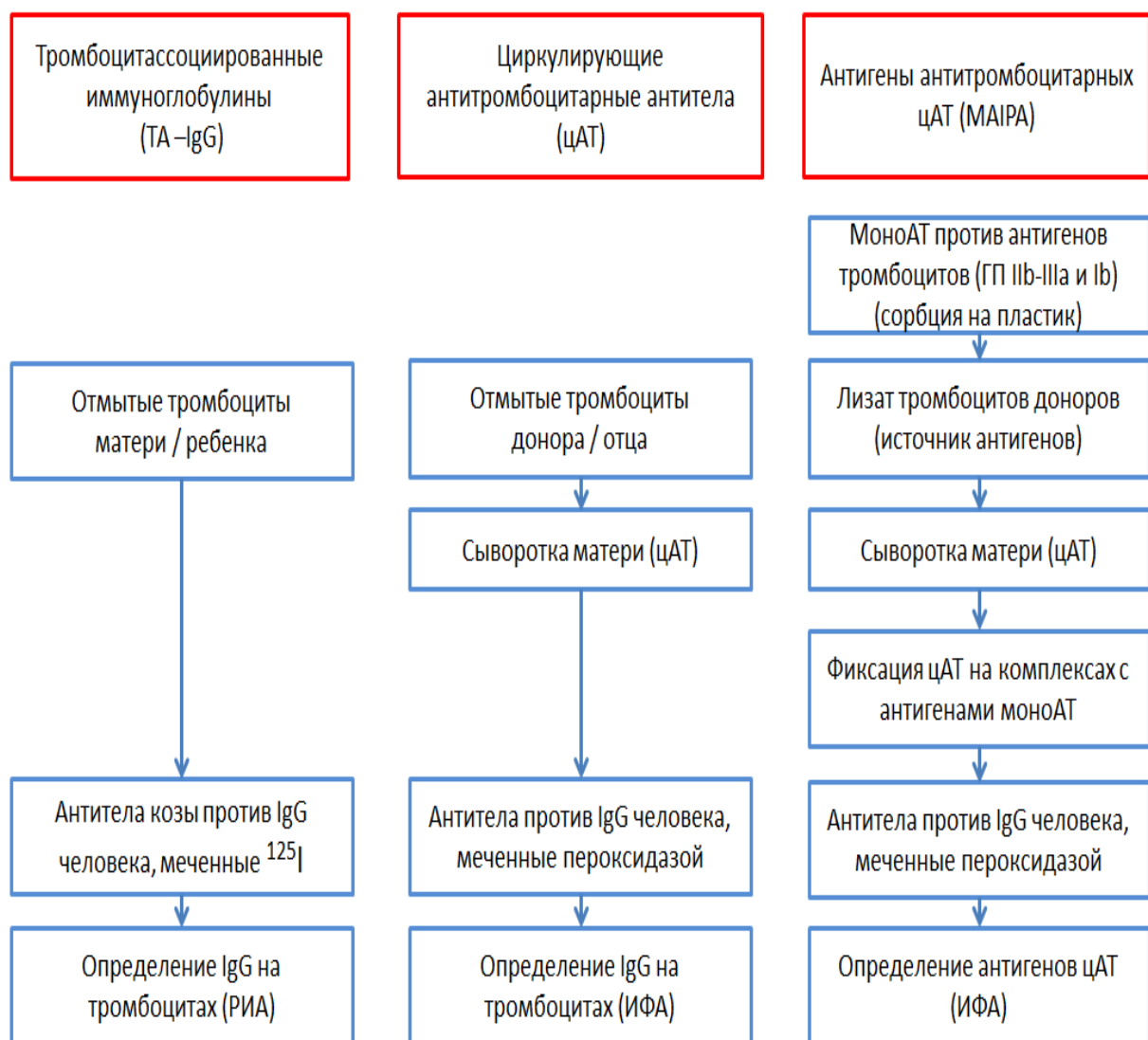


Рис. 1. Используемые в работе методы определения антитромбоцитарных антител.

Определение анти-HLA антител в сыворотках матерей с ИТП, проводили с помощью комплимент зависимого цитотоксического теста (лимфоцитотоксический тест) [Bodmer J *et al.*, 1966] с некоторыми модификациями, как описано в работе Головкиной Л.Л. и соавторов [Golovkina L. L. *et al.*, 2003].

Статистика. Статистический анализ был выполнен в программе: Statistica 10 (Stat. Soft, USA). Данные представляли, как медианы, 25% и 75% перцентили. Для сравнения групп использовали непараметрический анализ, поскольку в выборках отсутствовало нормальное распределение, – тест Манна-Уитни (Mann-Whitney) для сравнения количественных параметров и тест Хи-квадрат для сравнения качественных показателей. При анализе корреляционных взаимосвязей использовали тест Спирмана. При анализе теста на антитромбоцитарные цАТ, как предиктора НТИТ: определяли чувствительность и специфичность, проводили анализ ROC кривых, рассчитывали прогностическую значимость.

Результаты исследования и их обсуждение.

Неонатальная трансиммунная тромбоцитопения (НТИТ). В настоящей работе мы проводили поиск предикторов НТИТ у новорожденных от женщин с ИТП. У 100 женщин, включенных в исследование, был установлен диагноз ИТП во время беременности. Было зафиксировано снижение количества тромбоцитов менее $100 \times 10^9/\text{л}$ ($56 (48 - 76) \times 10^9/\text{л}$), исключены не иммунные причины тромбоцитопении, а уровень ТА-IgG был выше 200% от контроля ($340 (290 - 410)\%$). Учет повышения ТА-IgG позволил исключить матерей с неспецифическим снижением уровня тромбоцитов на поздних сроках беременности. Уровень плазменного гликокалицина, характеризующего оборот тромбоцитов, не был снижен – ($1,8 (1,5 - 1,95)$ мкг/мл) по сравнению с показателями в контрольном пуле от 10 здоровых доноров (2 мкг/мл), что указывает на отсутствие подавления мегакариоцитов костного мозга. У беременных женщин с ИТП была зафиксирована типичная для ИТП сильная обратная корреляция между количеством тромбоцитов и уровнем ТА-IgG ($r = -0.774$, $p < 0.001$), что подтверждает определяющую роль аутоантител в развитии тромбоцитопении.

После родов матерей разделили на 2 группы – 37 матерей, у которых родились дети с нТП, и 63 матери, у которых родились дети без нТП (нТП+ и нТП- группы соответственно). В группе нТП+ содержание тромбоцитов у новорожденных в первые сутки после рождения было ниже $100 \times 10^9/\text{л}$ ($47 (33 - 61) \times 10^9/\text{л}$). Уровень ТА-IgG

составлял 270 (210 - 370) % от уровня здоровых доноров и у 28 детей был выше 200%, хотя ТА-IgG измеряли на 2-5 сутки после рождения. К этому времени содержание тромбоцитов у части новорожденных уже выросло по сравнению с первым днем после родов, и большинство (19 детей) получило лечение внутривенными иммуноглобулинами, что могло повлиять на уровень определяемого ТА-IgG по сравнению с первыми сутками после рождения.

Из таблицы 1 видно, что группы нТП+ и нТП- не имели значимых различий по возрасту, времени начала ИТП (до/во время беременности), частоте использования кортикостероидов, количеству тромбоцитов, СОТ, и уровню ТА-IgG. Количество спленомегалий было минимальным – одна женщина в группе нТП+. Обе группы достоверно отличались только по одному признаку – наличию антитромбоцитарных цАТ, которые определяли, используя адгезированные тромбоциты здоровых доноров, как мишени для АТ из сывороток матерей.

Таблица 1. Характеристика матерей с ИТП, у которых родились дети с и без нТП (нТП+ и нТП- группы)

Показатели матерей с ИТП	Группа нТП+ (n = 37)	Группа нТП- (n = 63)	p
Возраст	28 (23 - 31)	30 (26 - 33)	н/д
ИТП до беременности, % (n)	29% (11)	35% (22)	н/д
Лечение кортикостероидами, % (n)	16% (6)	19% (12)	н/д
Спленэктомия, % (n)	3% (1)	0% (0)	н/д
Кол-во тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	58 (45 - 68)	59 (43 - 79)	н/д
Средний объем тромбоцитов, фл	9,7 (9,2 - 10,3)	9,9 (9,1 - 11,0)	н/д
ТА-IgG, % от контроля	360 (310 - 420)	320 (270 - 400)	н/д
Уровень гликокалицина, мкг/мл	1,8 (1,5 - 1,9)	1,8 (1,5 - 2,0)	н/д
цАТ, % (n)	89% (33)	3% (2)	< 0.001

Представлены медианы (25%-75%), проценты (n)

Примеры определения цАТ в сыворотках у матерей с ИТП представлены на Рис. 2. В иммунологических методах, как в тесте ИФА на цельных тромбоцитах, так и далее в тесте МАРА (см. ниже) для исключения неспецифических ложноположительных реакций был применен следующий подход. При раститровке ответ фиксировался как положительный только тогда, когда положительная реакция в титре 1 (сыворотка без

разведения) воспроизводилась в титре 2. Это было обусловлено тем, что в предварительных экспериментах наблюдалось неспецифическое увеличение A_{492} при добавлении некоторых неразведенных контрольных сывороток (доноры без ИТП) к иммобилизованным на пластике тромбоцитам и даже в лунках без тромбоцитов. Пример ложноположительной сыворотки, с показателями, незначительно превышающими контрольные (сыворотка донора), только без разведения (пациентка РО), и кривые связывания двух положительных сывороток с титром 4 и 32 (пациентки ПУ и РА), представлены на Рис. 2. То есть все положительные сыворотки имели титр ≥ 2 . Такой подход позволил избегать ложноположительных ответов и повысил специфичность теста.

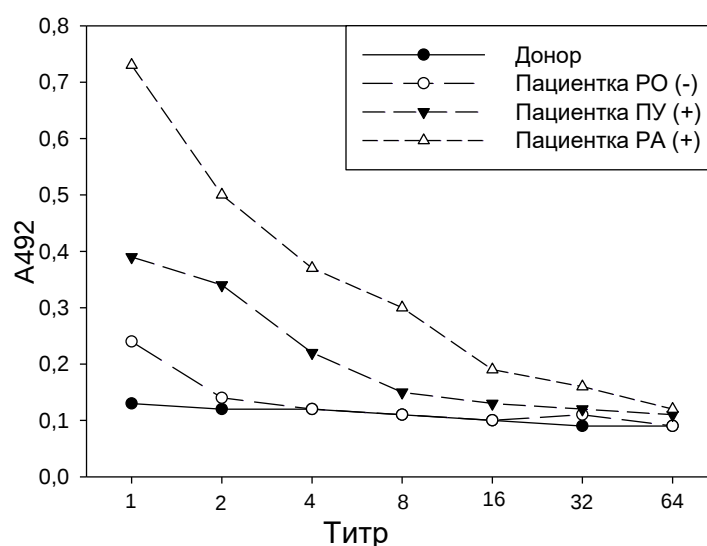


Рис. 2. Определение антитромбоцитарных цАТ, реагирующих с тромбоцитами здоровых доноров, у пациенток с ИТП. ИФА. К адгезированным тромбоцитам добавляли следующие сыворотки в различных титрах: сыворотка здорового донора (отрицательный контроль) (“Донор”, (●)); сыворотка пациентки РО, которую не считали положительной в связи с незначительным повышением A_{492} лишь при титре 1 по сравнению с контрольной сывороткой, которое не воспроизвелось при титре 2 (“Пациентка РО”, (○)); положительная сыворотка пациентки ПУ с титром 4 (“Пациентка ПУ”, (▼)); положительная сыворотка пациентки РА с титром 32 (“Пациентка РА”, (△)). Уровень связывания с тромбоцитами цАТ в анти-НРА-1а сыворотке в титре 16, использованной в качестве положительного контроля, составил 0,652 A_{492} .

Антитромбоцитарные цАТ, были выявлены у 33 из 37 матерей в группе нТП+, и у 2 из 63 матерей, в группе нТП– (см. Таблицу 1). Чувствительность теста составила 89%, а специфичность – 97%. Площадь под ROC-кривой, построенной в зависимости от наличия нТП у новорожденных и титра цАТ в крови у матерей с ИТП, составила 0,939 (Рис. 3), что говорит о высокой прогностической возможности теста. Прогностическая значимость положительного результата составила – 94%, а отрицательного результата – 93,8%.

При выполнении анализа на цАТ сыворотку матерей добавляли в титрах от 1 (без разведения) до 64. Титры цАТ в 33 положительных сыворотках варьировали от 2 до 32: 10 с титром 2; 7 с титром 4; 8 с титром 8; 7 с титром 16 и 1 с титром 32. Две сыворотки, реагирующие с тромбоцитами в нТП– группе, имели титр 2.

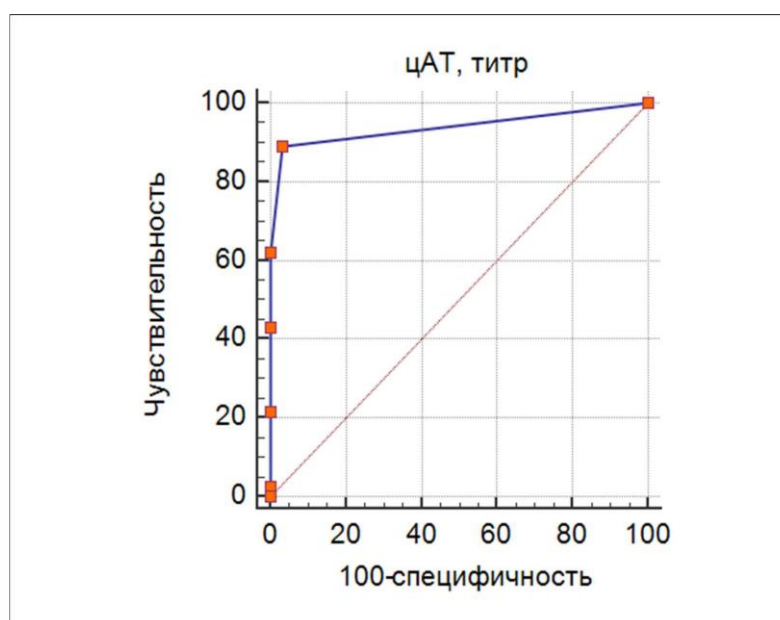


Рис. 3. ROC анализ. Титр цАТ (≥ 0 , >0 , >2 , >4 , >8 , >16 , >32) у матерей с ИТП и наличие нТП у новорожденных. Титр «0» - отсутствие цАТ в крови у матери.

В группе нТП+ наблюдалась сильная обратная корреляция между титром материнских цАТ и содержанием тромбоцитов у новорожденных: $r = -0,774$, $p < 0,001$, $n = 37$ (отсутствие цАТ соответствовало титру 0), что иллюстрирует Рис. 4.

Таким образом, степень тяжести неонатальной тромбоцитопении у новорожденных напрямую зависит от количества циркулирующих антитромбоцитарных антител в крови у матерей.

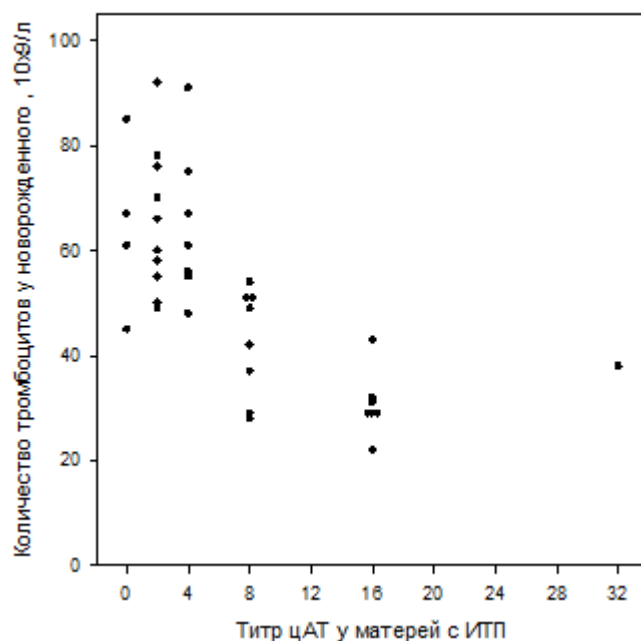


Рис. 4. Обратная корреляция титра цАТ у матерей с ИТП и количества тромбоцитов у новорожденных в группе нТП + ($r = -0,749$, $p < 0,001$). Титр «0» - отсутствие цАТ в крови у матери.

Антигенную направленность цАТ у части матерей с ИТП определяли с помощью антиген специфического теста МАІРА, рассматривая главные антигены тромбоцитов – ГП ІІb-ІІІа и ГП Іb, как основные мишени. Типичные кривые связывания антитромбоцитарных цАТ в разных титрах с ГП ІІb-ІІІа и ГП Іb приведены на Рис. 5.

Также нельзя исключить потерю и/или изменение аффинитета части эпитопов тромбоцитарных антигенов при приготовлении лизата тромбоцитов для теста МАІРА, несмотря на использование мягкого, не ионного детергента, Тритона Х-100. Не было обнаружено никаких взаимосвязей между наличием и титром анти-ГП ІІb-ІІІа антител и в тесте МАІРА и титром реагирующих с тромбоцитами цАТ, $r = 0,182$, $p = 0,456$, $n = 19$ (отсутствие анти-ГП ІІb-ІІІа антител соответствовало титру 0). То есть тест МАІРА, оказался малоинформативным как для прогноза неонатальной тромбоцитопении, так и для характеристики антитромбоцитарных цАТ.

Антитела против HLA аллоантигенов обнаруживаются у 15–20% беременных женщин. Мы идентифицировали их в сыворотках части матерей с ИТП в группах нТП+ и нТП- с помощью комплимент зависимого цитотоксического теста. Антитела к HLA были обнаружены у 3 женщин из 11 в группе нТП+ и у 2 из 12 в группе нТП-. Не было выявлено никакой взаимосвязи между наличием анти-HLA антител и титром антитромбоцитарных

цАТ. Эти данные указывают на то, что анти-HLA антитела не влияют на развитие и глубину неонатальной тромбоцитопении у детей, и крайне редко могут вызывать тромбоцитопению. Судя по литературным данным, таких случаев было зарегистрировано не более нескольких десятков [Bonstein L., et al., 2017].

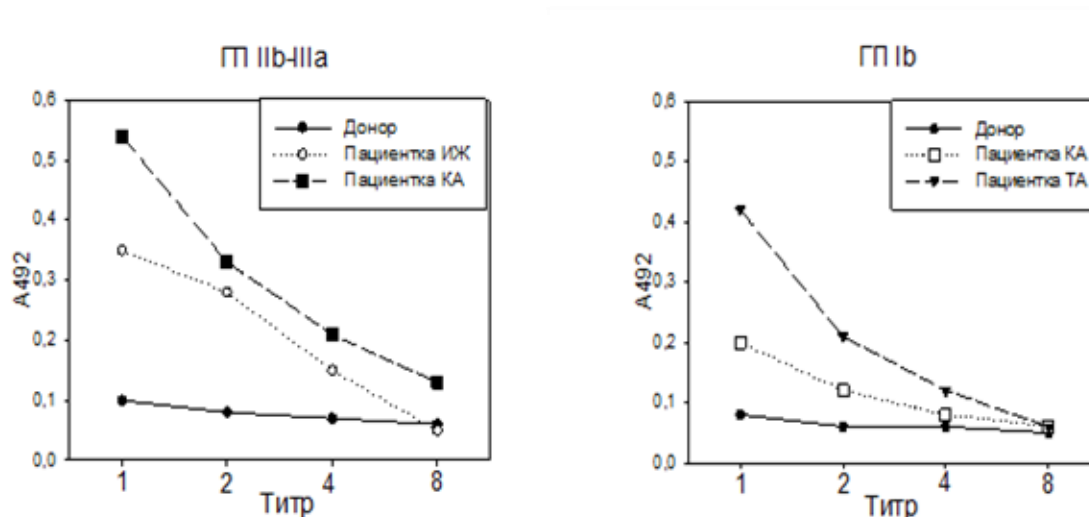


Рис. 5. Определение цАТ, реагирующих с иммобилизованными ГП IIb-IIIa и ГП Ib, у пациенток с ИТП. МАІРА. к иммобилизованному ГП IIb-IIIa (ГП IIb-IIIa) добавляли следующие сыворотки в различных титрах: контрольная сыворотка здорового донора (“Донор”, (●)); сыворотка пациентки ИЖ с титром 4 (“Пациентка ИЖ”, (○)); сыворотка пациентки КА с титром ≥ 8 (“Пациентка КА”, (■)). Уровень связывания с иммобилизованным ГП IIb-IIIa цАТ из анти-НРА-1a сыворотки в титре 16, использованной в качестве положительного контроля, составил 0,579 А492. К иммобилизованному ГП Ib (ГП Ib) добавляли следующие сыворотки в различных титрах: контрольную сыворотку здорового донора (“Донор”, (●)); сыворотку пациентки КА с титром 2 (“Пациентка КА”, (□)); сыворотку пациентки ТА с титром 4 (“Пациентка ТА”, (▼)).

Неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения (НАИТ)

Особенности патогенеза НАИТ в российской популяции исследовались в 27 семьях, в которых родители относили себя к русским или другим европейским популяциям России, а у детей был установлен диагноз НАИТ. У матерей не фиксировалась тромбоцитопения (уровень тромбоцитов был не ниже $150 \times 10^9/\text{л}$), не было повышения уровня ТА-IgG выше 200% от уровня контрольных доноров. (Характеристика матерей – см. Таблица 2). Эти данные указывают на отсутствие у матерей ИТП и

исключают возможность рождения ребенка с НТИТ. Не было выявлено не иммунных причин, способных вызвать нТП у новорожденных. Тем не менее у всех детей в этих семьях в первые сутки после рождения и до начала лечения внутривенным введением иммуноглобулинов было зарегистрировано снижение количества тромбоцитов ниже $100 \times 10^9/\text{л}$ ($45 (18-80) \times 10^9/\text{л}$).

Таблица 2. Характеристика матерей в семьях, где родились дети с НАИТ

Характеристики пациенток (n=27)	
Возраст, лет	30 (28,5-31,5)
Кол-во тромбоцитов во время беременности, $\times 10^9/\text{л}$	177 (165-195)
Уровень ТА-IgG, % от контроля	150 (137-175)
У предыдущих детей после рождения диагностировали нТП	3 (11%)
Выкидыш в анамнезе	4 (14%)
Антитромбоцитарные цАТ реагирующие с тромбоцитами отца, но не матери	27 (100%)

Представлены медианы (25%-75%), проценты (n)

Подтверждали иммунный характер тромбоцитопении у новорожденных, измеряя уровень ТА-IgG на 3–5 сутки после рождения. У всех детей уровень ТА-IgG был выше 200% от контрольных значений у здоровых доноров – (370 (250–550) %). У всех матерей в крови были обнаружены цАТ, реагирующие с тромбоцитами отца, но не реагирующие с их собственными тромбоцитами, что является ключевым диагностическим критерием НАИТ. На тромбоцитах отца представлены конфликтные аллоантигены, общие с новорожденным, но отсутствующие на тромбоцитах матери. Определение цАТ проводили методом ИФА, используя в качестве мишени иммобилизованные на пластике тромбоциты отца ребенка. Тромбоциты новорожденных с тромбоцитопенией не использовали в этом анализе по следующим причинам: 1) трудности связанные со взятием крови в достаточном количестве для данного анализа у новорожденного; 2) целевые эпитопы аллоантигенов на поверхности тромбоцитов новорожденного могут быть оккупированы материнскими аллоантителами. Типичные кривые связывания цАТ с тромбоцитами отца приведены на рис. 6. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку здорового донора, а в качестве положительного – ранее охарактеризованную анти-НРА-1a сыворотку.

В данном исследовании все протестированные образцы сыворотки от 27 матерей реагировали с тромбоцитами от отцов в титрах от 4 до 64 и не реагировали с тромбоцитами самих матерей. Эти данные наряду с отсутствием тромбоцитопении у матери, и отсутствием не иммунных причин развития нТПП позволил выставить всем новорожденным в этих семьях диагноз НАИТ.

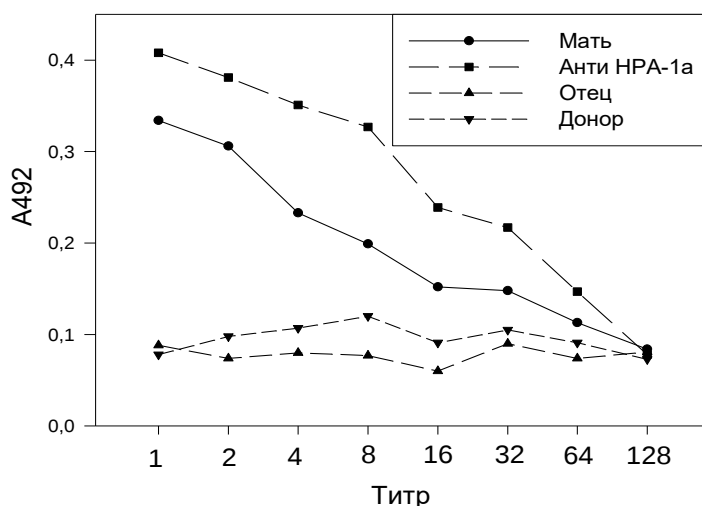


Рис. 6. Связывание аллоантител матери ребенка с НАИТ с тромбоцитами отца. ИФА. Мать с НРА-1b/1b, ребенок с НРА-1a/1b и отец с НРА-1a/1a генотипами. К адгезированным на пластике тромбоцитам отца добавляли в различных разведениях (титрах): сыворотку матери («мать», ●), ранее охарактеризованную анти-НРА-1a сыворотку («анти-НРА-1а», (■) – положительный контроль), сыворотку отца («отец», (▲) и сыворотку здорового донора («донор», (▼) – отрицательный контроль).

После постановки диагноза НАИТ проводили исследование молекулярной природы НРА-аллоантигенных конфликтов, выполняя генотипирование НРА-1, -2, -3, -4, -5 и -15 аллоантигенов у матерей, детей и части отцов. С помощью такого подхода НРА конфликтные антигены были выявлены в 23 из 27 семей (таблица 3). Среди 23 семей в 16 (70%) выявлена несовместимость по НРА-1 аллоантигену с одинаковой частотой (35%) конфликтов по НРА-1a (мать – НРА-1b/b и ребенок с НРА-1a) и НРА-1b (мать – НРА-1a/1a, ребенок с НРА-1b) антигенам. В некоторых случаях конфликты по НРА-1 сочетались с другими возможными несовместимостями – НРА-1a + НРА 2b ($n=1$); НРА-1a + НРА-3b ($n=1$) и НРА-1b + НРА-5a ($n=2$). В 5 из 23 семей (22%) зарегистрированы изолированные конфликты по НРА-15 аллоантигенам (2 по НРА-15a и 3 по НРА-15b). Таким образом, по частоте встречаемости несовместимость по НРА-15 оказалась на втором месте после несовместимости по НРА-1. Изолированный конфликт по НРА-3b

антигену зарегистрирован в 1 (4%) семье и по HPA-5b – также в 1 (4%) семье. В 4 из 27 семей генотипирование HPA-1, -2, -3, -4, -5 и -15 не выявило несовместимостей, что вероятно, указывает на наличие конфликтов по другим аллоантигенам.

Таблица 3. Конфликты по HPA аллоантигенам при НАИТ

Конфликтный аллоантиген	<i>n</i> (%) ¹	Титры аллоантител в сыворотке матерей (против тромбоцитов отца)
HPA-1a	8 (35) ²	16-64
HPA-1a + HPA-2b	1	32
HPA-1a + HPA-3b	1	32
HPA-1b	8 (35) ²	16–64
HPA1b + HPA-5a	2	16; 64
HPA-3b	1 (4) ³	16
HPA-5b	1 (4) ³	16
HPA-15a	2 (9) ³	4; 4
HPA-15b	3 (13) ³	4; 8; 8

¹ % из 23 зарегистрированных генотипированием HPA конфликтов.

² В том числе комбинированные несовместимости HPA-1a + HPA-2b, HPA-3b и HPA1b + HPA-5a.

³ Изолированные несовместимости по одному аллоантигену.

Высококчувствительный тест ИФА (с использованием нативных тромбоцитов в качестве мишеней) позволил выявить разницу в титрах аллоантител при конфликтах по разным HPA антигенам. Наиболее высокие титры материнских цАТ, реагирующих с тромбоцитами отца, зарегистрированы в семьях с HPA-1 конфликтами (как с HPA-1a, так и с HPA-1b) – от 16 до 64, а наиболее низкие – в семьях с HPA-15 конфликтами – от 4 до 8. В семьях с HPA-3b и HPA-5b несовместимостью в обоих случаях зарегистрированы титры антител 16 (таблица 3). Наиболее низкие титры – при HPA-15 конфликтах, что скорее всего связано с низким уровнем экспрессии этого аллоантигена, локализованного в CD109 белке, – около 1000 копий на 1 тромбоцит [Curtis B., et al., 2014]. Высокие титры – при HPA-3 и -5 и наиболее высокие – при HPA-1 конфликтах, так же вероятно связаны с уровнем экспрессии HPA-1 и -3 аллоантигенов, локализованных в ГП IIb-IIIa (α IIb/ β 3 интегрин) и HPA-5 аллоантигена, локализованного в ГП Ia-IIa (α 2 β 1 интегрин),

существенно выше – около 80 000 и 10 000 копий на 1 тромбоцит соответственно [Ikeda Y., et al., 2008].)

В данной работе были впервые изучены причины НАИТ в российской популяции. Результаты исследования показали, что в России частота встречаемости конфликтов по некоторым НРА антигенам, вызывающим развитие НАИТ, существенно отличается от таковых в других европейских популяциях (таблица 4).

Таблица 4. Конфликты по НРА аллоантигенам при НАИТ в российской популяции и в европейских популяциях.

Конфликтный аллоантиген	% Конфликтов			
	Российская популяция	Европейские популяции*		
		Польша	Великобритания	Дания
НРА-1a	35	91,4	75	73
НРА-1b	35	2,1	1,5	8,5
НРА-3b	4	-	-	3,3
НРА-5b	4	6,5	15,5	11,8
НРА-15a	9	-		
НРА-15b	13	-	4	3,4

*[Curtis B.R. and McFarland J.G, 2014]

У части матерей провели подтверждение антигенной специфичности цАТ, полученной по данным генотипирования, методом МАРА. Во всех случаях анализировали связывание аллоантител из сыворотки матерей, предположительно (по результатам НРА генотипирования) направленных против НРА-1a и -1b (генотипы матерей НРА-1b/b и -1a/a соответственно), а в качестве мишеней использовали ГП IIb-IIIa, иммобилизованный из лизата тромбоцитов доноров с известными генотипами НРА-1a/a и -1b/b. Кривые связывания приведены на рис.7. Положительные реакции регистрируются только при добавлении сыворотки пациентки с генотипом НРА-1a/a к ГП IIb-IIIa донора с генотипом НРА-1b/b и сыворотки пациентки с генотипом НРА-1b/b к ГП IIb-IIIa донора с генотипом НРА-1a/a, что подтверждает наличие у этих матерей аллоантител со специфичностью, соответствующей результатам генотипического анализа. Было протестировано 16 сывороток предварительно генотипированных по НРА-

1 матерей. Во всех случаях результаты иммунологического теста МАИРА совпали с результатами генотипирования.

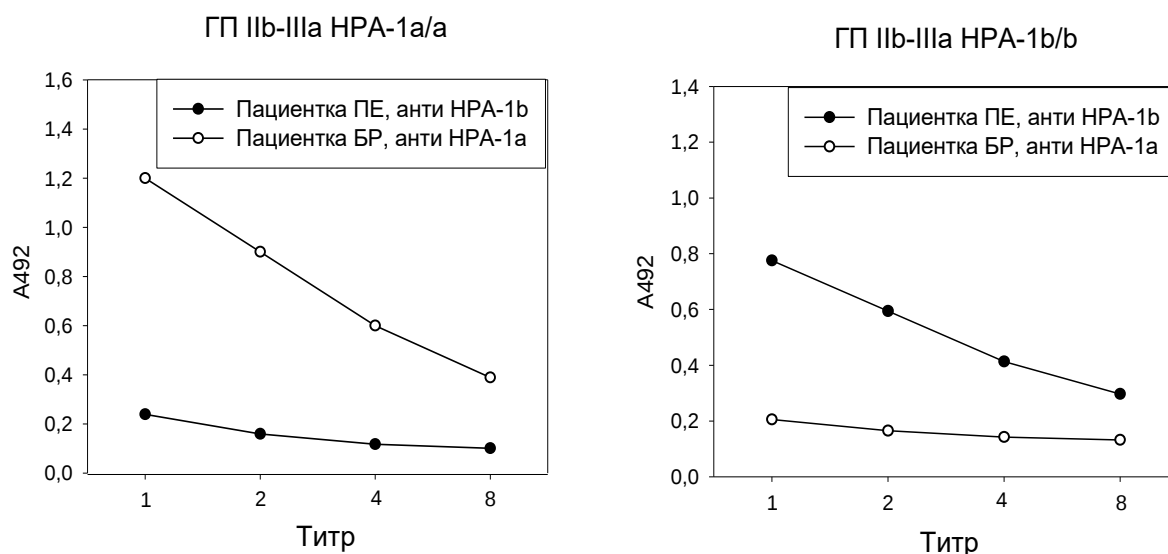


Рис. 7. Связывание цАТ с антигеном из лизата тромбоцитов типированных доноров. ГП IIb-IIIa иммобилизовали из лизата доноров – с генотипом ГП IIb-IIIa HPA-1a/a и ГП IIb-IIIa HPA-1b/b. К ГП IIb-IIIa добавляли в различных титрах сыворотки матерей (пациенток), родивших детей с НАИТ, в крови которых содержатся цАТ против тромбоцитов отцов. Пациентка ПЕ (●) имела генотип HPA-1a/a и предположительно (по результатам генотипирования) вырабатывала аллоантитела против HPA-1b аллоантигена, а пациентка БР (○) имела генотип HPA-1b/b и предположительно (по результатам генотипирования) вырабатывала аллоантитела против HPA-1a аллоантигена. Результаты антигенного анализа подтверждают результаты генотипирования. цАТ пациентки ПЕ (генотип HPA-1a/a) реагировали только с ГП IIb-IIIa HPA-1b/b, а пациентки БР (генотип HPA-1b/b) только с ГП IIb-IIIa HPA-1a

В настоящей работе впервые изучены причины НАИТ в российской популяции. Известно, что у лиц белой расы в США и в странах Европы наиболее частой причиной НАИТ является несовместимость по HPA-1a аллоантигену, когда мать, гомозиготная по более редкому HPA-1b аллелю, вырабатывает антитела против тромбоцитов плода, несущих унаследованный от отца HPA-1a вариант этого антигена. Такие конфликты регистрируются в 70--80% НАИТ в этих популяциях [Bussel J., et al., 2008, Zdravic D., et al., 2016]. В 23 семьях, в которых мы идентифицировали природу HPA конфликтов, наиболее частой причиной несовместимости оказались HPA-1 аллоантигены (16 из 23 семей, 70%),

но с одинаковой частотой конфликтов по HPA-1a и по HPA-1b вариантам (по 8 случаев, 35%).

Кроме того, второй, наиболее частой причиной НАИТ оказались HPA-15 конфликты – 22% (5 из 23 семей). HPA-15 конфликты в ранее обследованных европейских популяциях встречаются реже и составляют по одним данным 4% [Biino G., et al., 2013], по другим менее 2% [Curtis B., et al., 2014]. В большинстве европейских популяций второе место среди причин НАИТ занимает несовместимость по HPA-5b антигену с частотой около 10–15% [Zdravic D., et al., 2016, Ghevaert C., et al., 2007]. В нашей группе зарегистрирован лишь один конфликт по этому аллоантигену.

Нужно отметить, что частота встречаемости разных аллельных вариантов HPA антигенов в России не отличается от других европейских популяций [Golovkina L., et al., 2011, Pchelina S., et al., 2017]. Поэтому единственное возможное объяснение столь большого вклада HPA-1b и HPA-15 конфликтов в развитие НАИТ в России – это более высокая вероятность алло-иммунизации матерей по этим аллоантигенам. Такое явление может быть обусловлено особенностями распределения в российской популяции HLA антигенов, участвующих в презентации HPA-1b и HPA-15. В частности, в соответствии с этим предположением у доноров русского происхождения зарегистрирована высокая частота HLA гаплотипов HLA-DRB1*07:01, -DQB1*02 [Khamaganova E., et al., 2017], наличие которых ассоциировано с продукцией HPA-1b алло-антител у HPA-1a/1a пациентов, которым проводились множественные переливания тромбоцитов [Golovkina L., et al., 2015].

Выводы

1. Наличие у матерей с ИТП циркулирующих антитромбоцитарных аутоантител, выявляемых по их реакции с тромбоцитами здоровых доноров, является предиктором развития неонатальной транссимунной тромбоцитопении у новорожденных. Тест обладает высокой чувствительностью – 89% и специфичностью – 97% (площадь под ROC кривой – 0,94).
2. Степень тяжести тромбоцитопении у новорожденных от матерей с ИТП коррелировала с уровнем циркулирующих антитромбоцитарных аутоантител в крови матери: коэффициент корреляции между титром аутоантител у матери и количеством тромбоцитов у новорожденных $r = -0,774$ ($p < 0,001$).

3. Наличие у матери с нормальным содержанием тромбоцитов циркулирующих аллоантител, реагирующих с тромбоцитами отца и не реагирующих с тромбоцитами матери, является маркером неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении у ребенка. Наиболее высокие титры аллоантител были зарегистрированы при несовместимости по HPA-1 аллоантигенам (как HPA-1a, так и HPA-1b) – от 16 до 64, а наиболее низкие – при несовместимости по HPA-15 аллоантигенам (от 4 до 8). В двух семьях с изолированной несовместимостью по HPA-3b и HPA-5b аллоантигенам титры антител составили 16.
4. Выявлены наиболее распространенные иммунологические конфликты, являющиеся причиной неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении в Российской популяции. Конфликты по HPA-1 аллоантигенам встречаются наиболее часто и составляют 70% (16 семей из 23) с одинаковой частотой конфликтов по HPA-1a (мать – HPA-1b/b и ребенок с HPA-1a) и HPA-1b (мать HPA-1a/1a, ребенок с HPA-1b) аллоантигенам. Вторыми по частоте были конфликты по HPA-15 аллоантигенам – 22% (5 семей из 23).
5. Разработан и апробирован алгоритм дифференциальной диагностики неонатальных иммунных тромбоцитопений с использованием методов определения антитромбоцитарных антител у матери и ребенка.

Практические рекомендации.

1. Для прогноза возможного развития и степени тяжести тромбоцитопении у новорожденного от матери с ИТП рекомендуется определять у нее наличие и титр циркулирующих антитромбоцитарных аутоантител в последнем триместре беременности и по возможности за месяц до родов.
2. Если у матери с нормальным количеством тромбоцитов и нормальным течением беременности и родов рождается ребенок с тромбоцитопенией неясного генеза, то для проверки диагноза аллоиммунной тромбоцитопении рекомендуется определить иммунологическую реактивность сыворотки матери по отношению к тромбоцитам отца. Так же это исследование рекомендуется проводить у беременных женщин без признаков тромбоцитопении, если у них в анамнезе были выкидыши неясной природы и/или у предыдущих детей при рождении диагностировалась тромбоцитопения неизвестной этиологии.

3. Линейка тестируемых антигенов при генотипировании семей, в которых родились дети с неонатальной аллоиммунной тромбоцитопенией, должна включать в первую очередь HPA-1 и HPA-15, аллоантигены, являющиеся наиболее частой причиной развития этой патологии в Российской популяции.

4. Для дифференциальной диагностики неонатальных иммунных тромбоцитопений рекомендуется использовать предложенный в работе алгоритм обследования матерей и новорожденных, включающий определение числа тромбоцитов и уровня тромбоцитассоциированных антител у матери и новорожденного и измерение циркулирующих антител в крови матери (рис. 8).

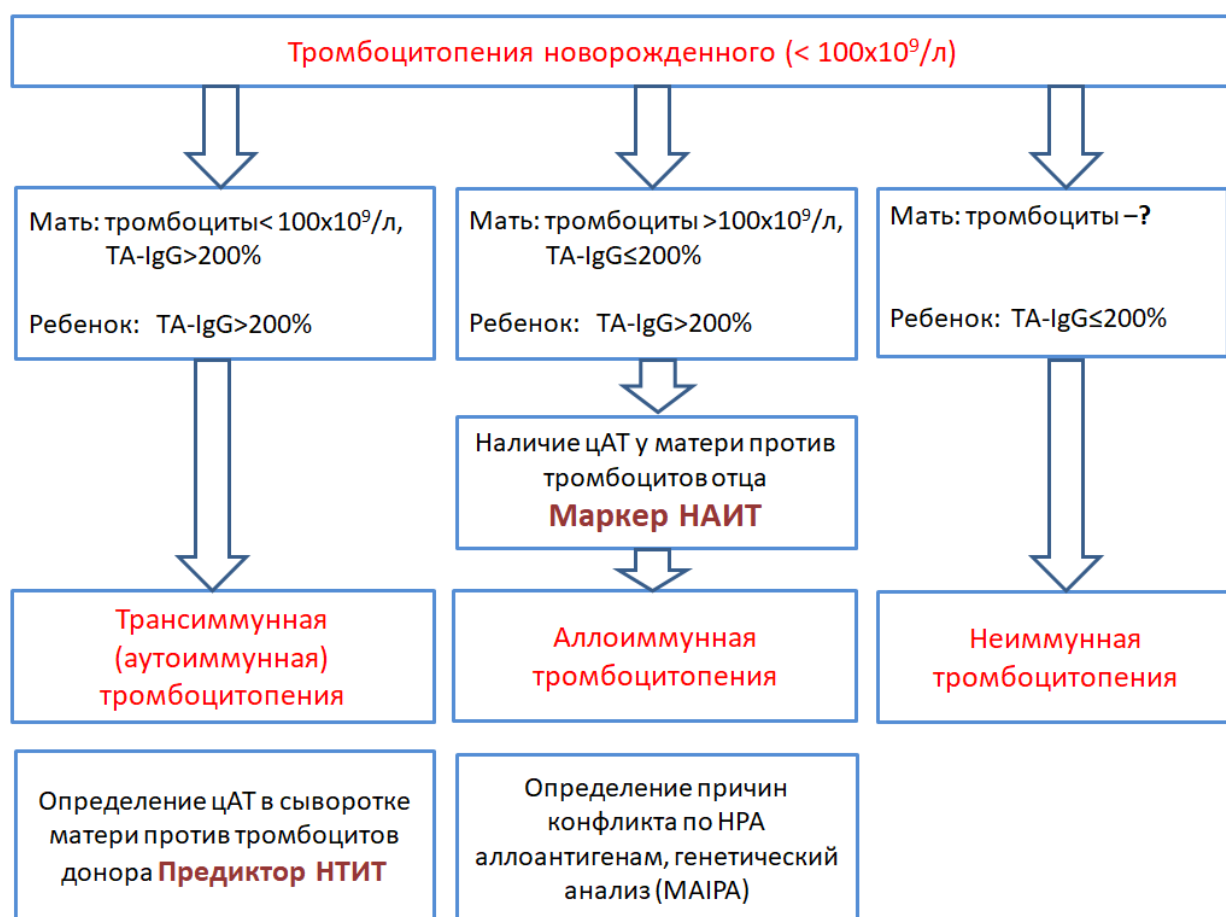


Рис.8. Дифференциальная диагностика неонатальных иммунных тромбоцитопений

Список научных трудов, опубликованных по теме диссертации.

1. Khaspekova S.G., **Shustova O.N.**, Golubeva N.V., Vasiliev S.A., Mazurov A.V. Relationships of mean platelet volume and plasma thrombopoietin with glyocalicin levels in thrombocytopenic patients // Acta Haematologica. 2015. – №133. – P. 295-299.
2. Khaspekova S. G., **Shustova O. N.**, Golubeva N. V., Naimushin Y. A., Larina L.E., Mazurov A. V. Circulating antiplatelet antibodies in pregnant women with immune thrombocytopenic purpura as predictors of thrombocytopenia in the newborns // Platelets. – 2019. – №7 – P 1-5
3. Ignatova A. A., Demina I. A., Ptushkin V. V., Khaspekova S. G., **Shustova O. N.**, Pankrashkina M. M., Ryabykh A. A., Obydenyi S. I., Strelkova O. S., Polokhov D. M., Seregina E. A., Poletaev A. V., Ataullakhanov F. I., Kireev I. I., Mazurov A. V., Maschan A. A., Novichkova G. A., Panteleev M. A. Evolution of platelet function in adult patients with chronic immune thrombocytopenia on romiplostim treatment // Br J Haematol. 2019. – №187. – P. 38-42.
4. Хаспекова С. Г., Головкина Л. Л., Донюш Е. К., Голубева Н. В., **Шустова О. Н.**, Мазуров А. В. Несовместимость матери и плода по тромбоцитарным аллоантигенам HPA-1a, -1b и -15 – главные причины неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении в России // Терапевтический архив. – 2018. - №7. – С. 65-69.
5. Хаспекова С. Г., **Шустова О. Н.**, Головкина Л. Л., Мазуров А. В. Диагностические маркеры и предикторы неонатальной иммунной тромбоцитопении // Гематология и трансфузиология. – 2019. – Т. 64. – № 2. – С. 198-210.
6. Mazurov A, Khaspekova S, **Shustova O**, Golubeva N, Donyush E, Golovkina L. Diagnostic markers and predictors of neonatal immune thrombocytopenia. Russian experience. ECTH 2018 European Congress on Thrombosis and Haemostasis. France // Abstract Book. 2018. - P. 68
7. Мазуров А.В., Хаспекова С.Г., **Шустова О.Н.**, Головкина Л.Л., Васильев С.А. Лабораторная диагностика тромбоцитопений. Тромбозы, гемостаз и патология сосудов: современные подходы к диагностике и лечению / Национальный конгресс с международным участием. Москва // Тезисы. 2014. - С. 42-43.
8. **Шустова О. Н.**, Хаспекова С. Г., Голубева Н. В., Наймушин Я. А., Ларина Л. Л. Поиск предикторов тромбоцитопении у новорожденных от матерей с иммунной тромбоцитопенической пурпурой / Объединенный международный конгресс Congress on

Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии. Санкт-Петербург // Сборник тезисов. – 2018. - С. 254-255.

9. Хаспекова С., Головкина Л., Голубева Н., **Шустова О.**, Донюш Е. Особенности иммунных конфликтов при неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении в российской популяции / Объединенный международный конгресс Congress on Open Issues in Thrombosis and Hemostasis совместно с 9-ой Всероссийской конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии. Санкт-Петербург // Сборник тезисов. – 2018. - С. 106-107.

Список сокращений:

АТ – антитела	РИА – радиоиммунный анализ
ГП – гликопротеин(ы)	СОТ – средний объем тромбоцитов
ИТП – иммунная	цАТ – циркулирующие
тромбоцитопеническая пурпура	(сывороточные/плазменные)
ИФА – иммуноферментный анализ	антитела
моноАТ – моноклональные антитела	ТА-IgG – тромбоцит-
НАИТ – неонатальная аллоиммунная	ассоциированные иммуноглобулины
тромбоцитопения	CD – Clusters of Differentiation
НТИТ – неонатальная трансиммунная	(Designation), кластеры
(аутоиммунная) тромбоцитопения	дифференцировки (обозначения)
нТП – неонатальная тромбоцитопения	НРА – Human Platelet Alloantigens,
МАІРА (Monoclonal Antibody	аллоантигены тромбоцитов человека
Immobilized Platelet Antigens) –	HLA – Human Leukocyte Antigens,
иммобилизованные с помощью	антигены лейкоцитов человека
моноклональных антител антигены	(антигены комплекса
тромбоцитов	гистосовместимости)