

## Розділ 10

# ІМУНОЛОГІЧНІ ПРИНЦИПИ ПЕРЕЛИВАННЯ КОНЦЕНТРАТІВ ТРОМБОЦИТІВ

### ЗМІСТ

10.1. Загальні принципи переливання КТ.....	285
10.2. Критерії ефективності перелитих КТ .....	285
10.3. Імунологічні принципи переливання тромбоцитів у хворих без резистентності до перелитих КТ.....	285
10.4. Імунологічні принципи переливання тромбоцитів у хворих із резистентністю до переливання КТ.....	286
10.4.1. Причини резистентності.....	286
10.4.2. Способи відбору донорів.....	288
10.4.2.1. Переливання КТ зі збереженням сумісності або часткової сумісності в антигенах HLA класу I (локус A і B) між донором та реципієнтом .....	288
10.4.2.2. Відбір донорів тромбоцитів для реципієнта на підставі негативних проб на сумісність ....	289
10.4.2.3. Відбір донорів для хворих з антитілами HLA визначеної специфічності.....	289
10.4.2.4. Відбір донорів для хворих із антитромбоцитарними антитілами визначеної специфічності.....	289
10.4.2.5. Реєстр донорів із визначеними антигенами HLA.....	290
10.4.2.6. Реєстр донорів із визначеними антигенами HPA.....	290
10.5. Переливання КТ у хворих з імунними тромбоцитопеніями.....	291
10.5.1. Алоімунна тромбоцитопенія у новонароджених .....	291
10.5.2. Посттрансфузійний діатез, пов'язаний із низьким рівнем тромбоцитів .....	291
10.5.3. Аутоімунна тромбоцитопенія .....	291
10.6. Методи виявлення антитіл, які мають значення при переливанні КТ .....	292
10.6.1. Методи виявлення лімфоцитотоксичних антитіл — тест на лімфоцитотоксичність .....	292
10.6.1.1. Спеціальне обладнання.....	292
10.6.1.2. Реактиви .....	292
10.6.1.3. Виділення лімфоцитів для тестування.....	293
10.6.1.4. Здійснення тестування.....	293
10.6.1.5. Використання тесту ЛЦТ у дослідженнях.....	294
10.6.1.5.1. Виявлення лімфоцитотоксичних антитіл у сироватці багаторазових реципієнтів крові.....	294
10.6.1.5.2. Як застосовувати тест ЛЦТ щодо проби на сумісність .....	294
10.6.2. Методи виявлення антитромбоцитарних антитіл .....	294
10.6.2.1. Імунофлюоресцентний тест із тромбоцитами — PIFT.....	294
10.6.2.1.1. Спеціальне обладнання.....	295
10.6.2.1.2. Реактиви .....	295
10.6.2.1.3. Виділення тромбоцитів.....	295
10.6.2.1.4. Приготування заморожених тромбоцитів.....	296
10.6.2.1.5. Приготування тромбоцитів з антигенами HLA, злущеними хлорохіном.....	296
10.6.2.1.6. Відбір тромбоцитів для тестування.....	296
10.6.2.1.7. Здійснення тестування.....	296
10.6.2.1.8. Оцінка флюоресцентного тесту .....	297

### 10.1. Загальні принципи переливання КТ

1. Переливання концентратів тромбоцитів має на меті зменшення кровотечі або запобігання кровотечам у хворих із нестачею тромбоцитів. Такі дії рекомендуються головним чином для хворих із тромбоцитопенією, яка є наслідком недостатнього вироблення тромбоцитів у кістковому мозку.

2. Переливання тромбоцитів рекомендоване хворим із кількістю тромбоцитів  $< 10 \times 10^9/\text{л}$  (деякі фахівці рекомендують тільки в тих випадках, якщо кількість тромбоцитів  $< 5 \times 10^9/\text{л}$ ). Рішення про переливання КТ має ухвалюватися з урахуванням клінічного стану хворого.

3. У реципієнтів багаторазових трансфузій тромбоцитів може розвинути резистентність до переливання тромбоцитів (кількість тромбоцитів не зростає, хоча це й очікується, та/або геморагічний діатез суттєво не зменшується).

4. Причини резистентності можуть бути неімунної та імунної природи.

- Неімунні причини: переважно жар, інфекція, гіперспленізм, синдром дисемінованого внутрішньосудинного згортання (ДВЗ-синдром), одночасне лікування амфотерицином В; фактори, що впливають на уповільнення вироблення тромбоцитів, наприклад, коагулопатія або ниркова недостатність.
- Імунні причини: алоїмунізація антигенами лейкоцитів (HLA), значно рідше — специфічними антигенами тромбоцитів (HPA).

### 10.2. Критерії ефективності перелитих КТ

Не існує цілком достовірних критеріїв оцінки ефективності переливання тромбоцитів. На практиці така оцінка ґрунтується:

1) на клінічному стані хворого — припинення кровотеч, зникнення петехій або підшкірних крововиливів.

2) лабораторних показниках — оцінці зростання кількості тромбоцитів у хворого (найчастіше задовільним вважають зростання на  $10 \times 10^9/\text{л}$  через 1 годину або на  $5 \times 10^9/\text{л}$  через 20–24 години).

3) обчисленні скоригованого показника зростання тромбоцитів після переливання КТ (CCI, англ. Corrected Count Increment) за формулою:

$$\text{CCI} = \frac{\text{кількість тромбоцитів після переливання } (10^{11}) - \text{кількість тромбоцитів до переливання } (10^{11})}{\text{кількість тромбоцитів у КТ } (10^{11})} \times \text{поверхня тіла } (\text{м}^2)$$

CCI відображає посттрансфузійне зростання кількості тромбоцитів, що припадає на  $1 \text{ м}^2$  поверхні тіла, після переливання  $1 \times 10^{11}$  тромбоцитів. Ефективним вважається CCI, вищий за 10 000 через 1 год. після переливання; неефективним вважається CCI  $< 7500$  через 1 год. та CCI  $< 5000$  через 24 год.

Оцінюючи зростання кількості тромбоцитів після переливання КТ, **резистентністю** ми називаємо відсутність відповідного зростання тромбоцитів (див. п. 2 і 3 вище) після чергових 2-х або 3-х переливань.

### 10.3. Імунологічні принципи переливання тромбоцитів у хворих без резистентності до перелитих КТ

1. Хворому слід переливати КТ від донора, сумісного за антигенами системи АВ0. Від цього принципу можна відійти, якщо сумісний донор є недоступним, а хворий має абсолютні показання для переливання КТ. Переливання тромбоцитів, не сумісних за антигенами АВ0, може не дати ефекту, а призвести до гемолізу, якщо у плазмі донора високий титр антитіл анти-А та/або анти-В.

2. Несумісність за антигеном RhD не впливає на результативність переливання тромбоцитів. Однак слід пам'ятати: невеличка кількість RhD-позитивних еритроцитів, що міститься у КТ, може створювати ризик вироблення антитіл анти-D. Якщо переливаються тромбоцити від Rh-позитивного донора, особливо Rh-негативній жінці у період фертильності, слід дати 50 мкг або 100 мкг імуноглобуліну анти-RhD, залежно від кількості еритроцитів у КТ, що переливається (зазвичай 20 мкг

імуноглобуліну анти-RhD на 1 мл перелитих Rh-позитивних тромбоцитів). Щоб запобігти імунізації антигеном RhD, після переливання несумісних тромбоцитів, отриманих шляхом аферезу, де домішка еритроцитів невелика, достатньо дати 50 мкг імуноглобуліну анти-D.

3. Сумісності між донором та реципієнтом за системою антигенів HLA та HPA для цієї групи хворих загалом не дотримуються.

4. У хворих, яким заплановано пересадку кісткового мозку, треба уникати переливань КТ, а особливо — КТ, узятих від найближчих родичів.

## 10.4. Імунологічні принципи переливання тромбоцитів у хворих із резистентністю до переливання КТ

### 10.4.1. Причини резистентності

1. Найчастішою імунною причиною резистентності є антитіла HLA, спрямовані до антигенів HLA класу I, які є наявними також на тромбоцитах, але їх експресія на цих антигенах загалом є слабшою, ніж на лімфоцитах. Причиною вироблення антитіл HLA стають лейкоцити, наявні у концентраціях еритроцитів або тромбоцитів. Сучасні методи збіднення препаратів на лейкоцити (див. п. 6.2.8 та 6.2.14) значно зменшують ризик імунізації антигенами HLA (від близько 30–70% до < 10% у хворих), але не виключають його зовсім. Вироблені антитіла HLA можуть тимчасово не виявлятися. У таблиці 10.1 подано список антигенів HLA класу I з урахуванням поділу деяких антигенів на підгрупи (англ. split), тоді як на рис. 10.1 і 10.2 продемонстровано перехресно реагуючі антигени (англ. Cross Reactive Antigens). Антитіла, а також антигени HLA можна виявити за допомогою тесту на лімфоцитотоксичність (LCT, ЛЦТ), див. п. 10.6.1.

Таблиця 10.1

**Антигени HLA класу I (локус А, В, С), що розпізнаються серологічним шляхом, згідно зі звітом Всесвітньої організації охорони здоров'я від 1996 р.**

Локус А	Локус В		Локус С
A1	B5	B51(5)	Cw1
A2	B7	B52(5)	Cw2
A3	B8	B53	Cw3
A9	B12	B54(22)	Cw4
A10	B13	B55(22)	Cw5
A11	B14	B56(22)	Cw6
A19	B15	B57(17)	Cw7
A23(9)	B16	B58(17)	Cw8
A24(9)	B17	B59	Cw9(w3)
A25(10)	B18	B60(40)	Cw10(w3)
A26(10)	B21	B61(40)	
A28	B22	B62(15)	
A29(19)	B27	B63(15)	
A30(19)	B35	B64(14)	
A31(19)	B37	B65(14)	
A32(19)	B38(16)	B67	
A33(19)	B39(16)	B70	
A34(10)	B40	B71(70)	
A36	B41	B72(70)	
A43	B42	B73	
A66(10)	B44(12)	B75(15)	
A68(28)	B45(12)	B76(15)	
A69(28)	B46	B77(15)	
A74(19)	B47	B78	
A80	B48	B81	
	B49(21)	Bw4	
	B50(21)	Bw6	

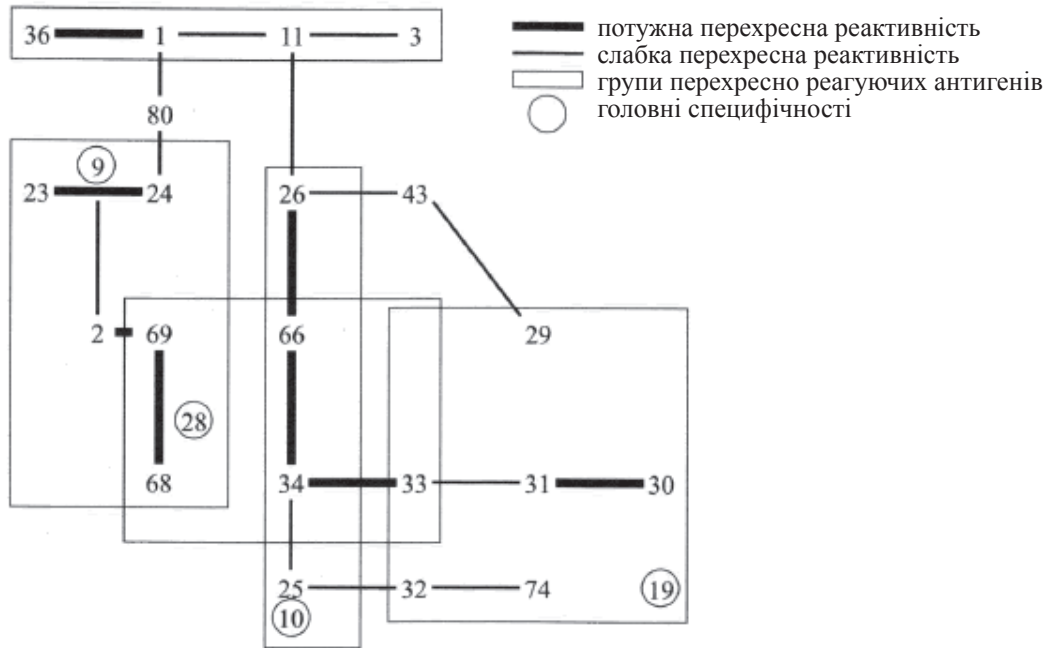


Рис. 10.1. Перехресно реагуючі антигени HLA з локусу А згідно зі Pel Freez Clinical System, 1996 рік (у власній модифікації)

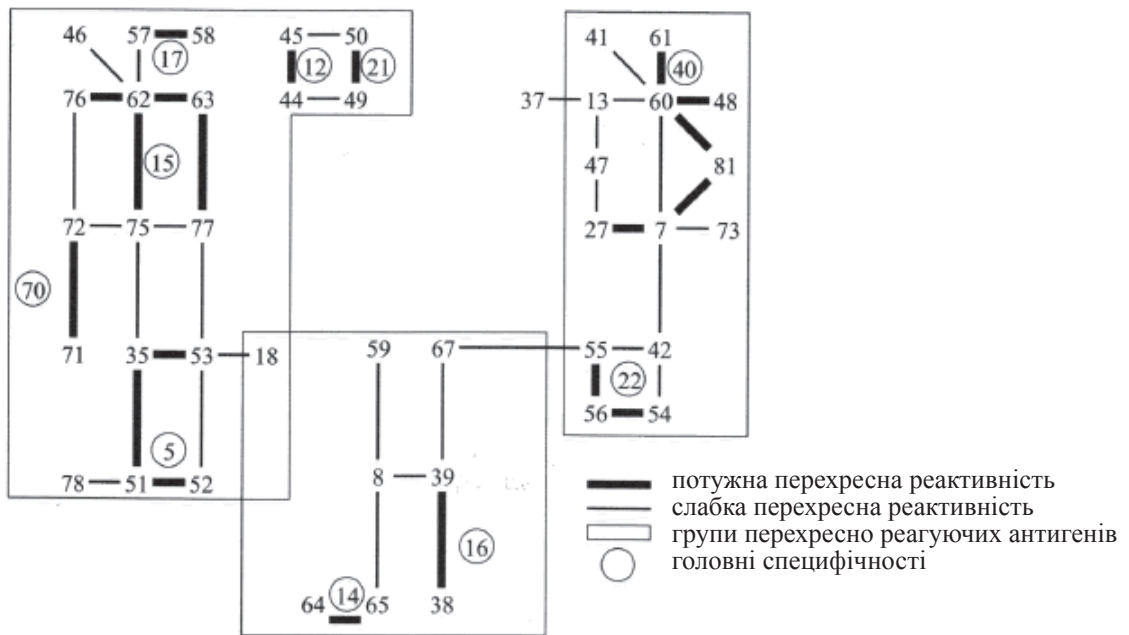


Рис. 10.2. Перехресно реагуючі антигени HLA з локусу В згідно зі Pel Freez Clinical System, 1996 рік (у власній модифікації)

2. Причиною резистентності хворих до переливань КТ може бути також імунізація антигенами НРА, які містяться на глікопротеїнах (GP) ІІb/ІІа, Іb та Іa/Іа (табл. 10.2). Частота вироблення цих антитіл повністю не досліджена. Вважається, що вони з'являються у менш ніж 10% хворих. Антитромбоцитарні антитіла можна виявляти шляхом імунофлюоресцентного тестування (PIFT, англ. Platelet ImmunoFluorescence Test), а також за допомогою імуноензимних тестів (див. п. 10.6.3). Специфічні антитромбоцитарні антитіла найчастіше спрямовані до антигенів НРА-1а, НРА-1b, НРА-5b та НРА-3а. У деяких хворих виявляються антитіла з кількома специфічностями. Іноді не вдається визначити специфічності антитромбоцитарних антитіл. Це можуть бути аутоантитіла. Відрізнити аутоімунізацію від алоімунізації важко, хоча визначення фенотипу або генотипу тромбоцитів хворого може полегшити висновок про наявність або відсутність алоімунізації. Зазвичай антитіла анти-НРА

супроводжуються антитілами анти-HLA. Тому важко чітко визначити, яку роль у виникненні резистентності до перелитих КТ мають саме антитіла анти-HPA. Участь цих антитіл є безсумнівною лише у тому випадку, коли йдеться про поєднання посттрансфузійного діатезу, пов'язаного з низьким рівнем тромбоцитів, та алоїмунної тромбоцитопенії у новонароджених (див. п. 10.5.1 та 10.5.2).

Таблиця 10.2

**Специфічні антигени тромбоцитів (згідно з Metcalfe P. & C°, Vox Sang., 2003 p.)**

Система	Антиген	Попередня назва	Локалізація на глікопротеїні
HPA-1	HPA-1a	Zw <sup>a</sup> , PI <sup>A1</sup>	GPIIIa
	HPA-1b	Zw <sup>b</sup> , PI <sup>A2</sup>	
HPA-2	HPA-2a	Kob	GPIIb <sub>a</sub>
	HPA-2b	Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	
HPA-3	HPA-3a	Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup>	GPIIb
	HPA-3b	Bak <sup>b</sup>	
HPA-4	HPA-4a	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup>	GPIIIa
	HPA-4b	Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	
HPA-5	HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup>	GPIa
	HPA-5a	Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup> , Hc <sup>a</sup>	
HPA-6W	HPA-6bW	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>	GPIIIa
HPA-7W	HPA-7bW	Mo <sup>a</sup>	GPIIIa
HPA-8W	HPA-8bW	Sr <sup>a</sup>	GPIIIa
HPA-9W	HPA-9bW	Max <sup>a</sup>	GPIIb
HPA-10W	HPA-10bW	La <sup>a</sup>	GPIIIa
HPA-11W	HPA-11bW	Gro <sup>a</sup>	GPIIIa
HPA-12W	HPA-12bW	ly <sup>a</sup>	GPIIb <sub>a</sub>
HPA-13W	HPA-13bW	Sit <sup>a</sup>	GPIa
HPA-14W	HPA-14bW	Oe <sup>a</sup>	GPIIIa
HPA-15W	HPA-15a	Gov <sup>b</sup>	CD109
	HPA-15b	Gov <sup>a</sup>	
HPA-16W	HPA-16b	Duv <sup>a</sup>	GPIIIa

3. Невиявлення антитіл, названих у п.1 та 2, може означати і те, що їх не виявили застосованими методами, або ж може свідчити про існування неімунних причин резистентності (п. 10.1).

**10.4.2. Способи відбору донорів**

У випадку резистентності хворих до перелитих КТ можна діяти по-різному.

**10.4.2.1. Переливання КТ зі збереженням сумісності або часткової сумісності в антигенах HLA класу I (локус A і B) між донором та реципієнтом**

Це може стосуватися як тих хворих, у яких антитіла анти-HLA можуть бути виявлені, так і тих, у яких вони не можуть бути виявлені. Слід:

- визначити антигени HLA класу I у хворого (це визначення треба здійснити раніше, ніж безпосередньо перед переливанням, оскільки, наприклад, у зв'язку з лікуванням одноразове обстеження не завжди є достатнім);

- шукати відповідного донора тромбоцитів у реєстрі донорів з визначеними антигенами HLA.

Знайти донора, сумісного з реципієнтом за 4-ма антигенами HLA класу I (2 антигени з локусу A та 2 антигени з локусу B), надзвичайно важко, відтак можна переливати КТ і в разі часткової сумісності антигенів HLA між донором та реципієнтом. У таблиці 10.3 подано різні ступені сумісності з урахуванням перехресно реагуючих антигенів, сплітів та невизначених антигенів. Серед осіб із невизначеними антигенами можуть бути гомозиготи за даним антигеном. З огляду на великий поліморфізм антигенів системи HLA реєстр донорів з визначеними антигенами HLA має містити щонайменше 2000 донорів (п. 10.4.2.5).

**Різні ступені сумісності за антигенами HLA класу I  
локусів A і B між донором та реципієнтом**

Ступінь сумісності	Число сумісних антигенів	Число перехресно реагуючих антигенів, або т. зв. сплітів, або невизначених*
Сумісний	4	0
Частково сумісний	3	1
Частково сумісний	2	2
Частково сумісний	1	3
Частково сумісний	0	4

\* Допускається також несумісність 1-го або 2-х антигенів

**10.4.2.2. Відбір донорів тромбоцитів для реципієнта на підставі негативних проб на сумісність**

Такі дії стосуються резистентних хворих (антитіла виявлені у тесті ЛЦТ та/або у тестах із використанням тромбоцитів, наприклад, у флуоресцентному чи ензимному). Найбільше використовують пробу на сумісність у тесті ЛЦТ. Деякі заклади служби крові здійснюють проби на сумісність із тромбоцитами у тесті, в якому виявлено антитіла.

**10.4.2.3. Відбір донорів для хворих з антитілами HLA визначеної специфічності**

Хворим, у яких вдалося визначити специфічність антитіл анти-HLA, можна переливати тромбоцити від донора, у котрого на лімфоцитах немає антигену, до якого спрямовані антитіла. Однак специфічність виявлених антитіл треба перевіряти після кожного переливання, тому цей спосіб відбору застосовують рідко.

**10.4.2.4. Відбір донорів для хворих із антитромбоцитарними антитілами визначеної специфічності**

Хворим, у яких виявлено специфічні антитромбоцитарні антитіла і підтверджено відсутність антигену, до якого спрямовані виявлені антитіла, треба переливати тромбоцити від донора, який теж не має цього антигену (слід спиратися на реєстр донорів із визначеними антигенами HPA, п. 10.4.2.6). На практиці такі випадки зустрічаються рідко.

***УВАГА!** У різних закладах служби крові, що існують у світі, використовують різні способи відбору тромбоцитів для резистентних хворих. Вибір правильних дій залежить від причини резистентності, від використовуваних у цьому пункті методів дослідження антитіл, а також від числа доступних донорів із визначеними антигенами HLA у реєстрі. Не існує абсолютного правила, який спосіб дій є найкращим; деколи вони застосовуються паралельно.*

На рис. 10.3 подано алгоритм дій у випадку хворих, які потребують переливання КТ; дії з відбору тромбоцитів залежать від можливостей кожного конкретного закладу.



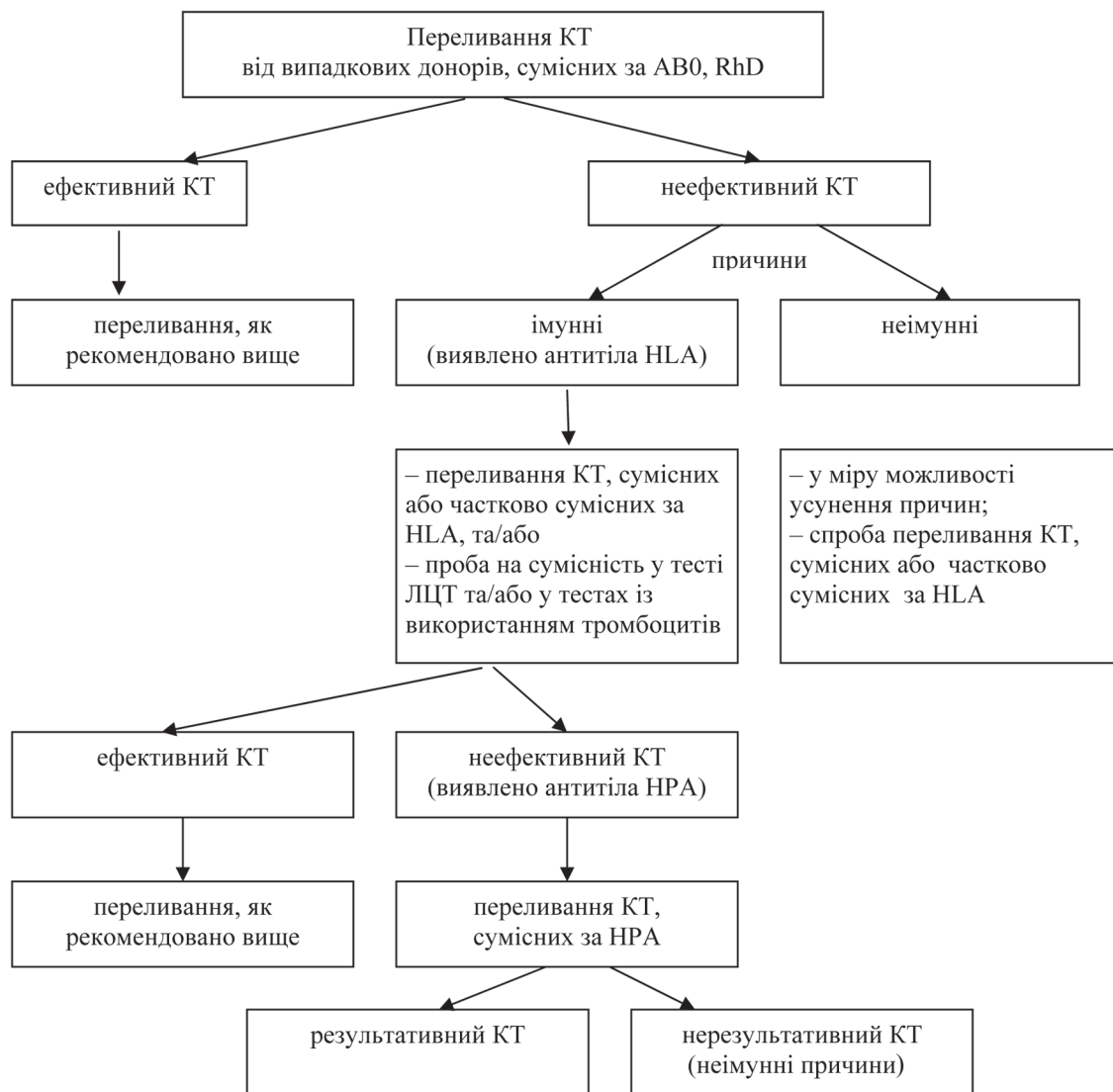


Рис. 10.3. Алгоритм дій у випадку хворих, які потребують переливання КТ

#### 10.4.2.5. Реєстр донорів із визначеними антигенами HLA

Центр донорства має забезпечити доступність тромбоцитів від донорів із визначеними антигенами HLA класу I шляхом створення бази, яка містить дані HLA донорів для трансфузійних цілей. Антигени HLA класу I можуть бути визначені серологічними методами або за допомогою молекулярних методів. Дослідження для трансфузійних цілей слід здійснювати методами з т. зв. низькою чутливістю або ж на рівні низької чутливості сприймати результати аналізів, проведених із вищою роздільністю. Відбираючи донора для переливання тромбоцитів, треба враховувати перехресно реагуючі антигени (рис. 10.1 і 10.2).

Антигени HLA класу I слід визначати у кадрових донорів. Результати аналізів HLA кандидатів у донори кровотворних клітин (такі аналізи здійснюються центром донорства — в осередку донорів кровотворних клітин (Розділ 12)) можуть використовуватися і для трансфузійних цілей за умови отримання свідомої згоди кандидата, а також згоди установи, яка фінансує аналізи. Набираючи донорів кісткового мозку, слід інформувати їх про необхідність використання тромбоцитів із визначеними антигенами HLA для рятування життя хворих, а отже, й про потребу в донорах тромбоцитів.

#### 10.4.2.6. Реєстр донорів із визначеними антигенами HPA

Центр донорства має забезпечити доступність тромбоцитів із визначеними антигенами HPA для реципієнтів крові з антитілами анти-HPA. Відтак, необхідно створити загальнодержавний реєстр донорів із визначеними антитромбоцитарними антигенами. У першу чергу треба створити реєстр

донорів із визначеними антигенами за системою HPA1 — з огляду на найбільшу частоту алоімунізації. Бажано створити реєстр, що міститиме відомості про інші антитромбоцитарні антигени, які рідше призводять до алоімунізації (HPA5b, -1b, -3a, -15a, -15b).

Найчастіше спостерігається алоімунізація антигеном HPA1a; вона ж є найсуттєвішою у клінічному плані. Антитіла анти-HPA1a виробляються особинами з фенотипом HPA1b/b (які становлять близько 2% популяції) після контакту з несумісним антигеном. У разі наявності антитіл анти-HPA1a для переливання відбирається кров без цього антигену. В особин HPA1a/a (їх близько 75%) може розвинути алоімунізація антигеном HPA1b, наявним у гомозигот HPA1b/b, а також у гетерозигот HPA1a/b, які становлять близько 24% популяції.

Визначення антигенів за системою HPA1 у донорів можна здійснити серологічними (ензимний тест, цитометричні тести) або молекулярними методами (ПЦР, у реальному часі).

Аналіз тромбоцитарних антигенів у донорів має бути підтверджений шляхом здійснення аналізу іншої, окремо взятої проби крові (що має на меті виключити помилку, яка може стосуватися першої аналізованої проби крові донора).

Крім того, з огляду на той факт, що аналізи тромбоцитарних антигенів, як серологічні, так і молекулярні, є складними технічно, — необхідним є додатковий підтверджувальний аналіз, що має здійснюватися в Інституті гематології та трансфузіології НАМН України, якщо початкові аналізи проводилися у Центрі донорства та гемотерапії. Проте, якщо початковий аналіз зроблено в Інституті гематології та трансфузіології НАМН України, необхідно його повторити з додаткової проби.

## 10.5. Переливання КТ у хворих з імунними тромбоцитопеніями

### 10.5.1. Алоімунна тромбоцитопенія у новонароджених

Алоімунна тромбоцитопенія у новонароджених (NAIT, англ. Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia) виникає внаслідок материнської резистентності до специфічних тромбоцитарних антигенів плода, успадкованих від батька та відсутніх на тромбоцитах матері. У близько 85% випадків NAIT виникає внаслідок імунізації матері до антигену HPA-1a плода. У решті випадків імунізація найчастіше виникає до HPA-5b, -1b, -3a. Новонародженому, в якого виникла NAIT, мають переливатися тромбоцити без антигену HPA, до якого виникла алоімунізація. У таких випадках, якщо відповідний донор тромбоцитів відсутній, ним може бути мати, але тоді з препарату слід усунути плазму, яка містить антитромбоцитарні антитіла (тобто приготувати відмитий КТ — п. 6.3.6.2.3 та 6.3.6.2.4).

### 10.5.2. Посттрансфузійний діатез, пов'язаний із низьким рівнем тромбоцитів

Посттрансфузійний діатез, пов'язаний із низьким рівнем тромбоцитів (PTR, англ. Post Transfusion Purpura), — це пізнє ускладнення, що може виникати через 5–11 діб після переливання крові або її препаратів, які містять тромбоцити. Найчастіше причиною PTR є наявність антитіл HPA-1a, значно рідше — HPA-1b, -3a, -3b. Ці антитіла виникають унаслідок вторинної імунної реакції в осіб, які вже мають первинну резистентність, пов'язану з тромбоцитарними антигенами (найчастіше у результаті вагітності, рідше — після переливання крові або її препаратів). Вироблені антитіла знищують не тільки перелиті тромбоцити, але й власні тромбоцити хворого; з огляду на це хворим із PTR не рекомендують переливати КТ. Якщо ж хворому з PTR необхідно перелити концентрат еритроцитів (КЕ), то ці еритроцити мають бути очищені від тромбоцитів, лейкоцитів та плазми. Загальною визначеною методом лікування PTR є внутрішньовенні ін'єкції імуноглобуліну G (i.v. IgG, англ. Intra Venous Immunoglobulinum G) упродовж 5 днів, денна доза — 0,4 г/кг маси тіла.

### 10.5.3. Аутоімунна тромбоцитопенія

Аутоімунна тромбоцитопенія може бути викликана наявністю антитромбоцитарних антитіл, спрямованих до основних глікопротеїнів тромбоцитарної оболонки, наприклад, GPIIb/IIIa або GPIb. Визначити специфічність цих антитіл загалом не вдається. Для цих хворих не рекомендують переливати КТ, оскільки аутоантитіла знищують також і донорські тромбоцити. Такі спостереження



стосуються хворих із аутоімунною гемолітичною анемією після переливання КЕ. КТ мають переливатися лише тим хворим, у яких геморагічний діатез загрожує життю.

## 10.6. Методи виявлення антитіл, які мають значення при переливанні КТ

У зв'язку з тим значенням, яке для хворих, котрим переливають КТ, мають антитіла НЛА та НРА, нижче подано методи виявлення цих антитіл.

### 10.6.1. Методи виявлення лімфоцитотоксичних антитіл — тест на лімфоцитотоксичність

Повсюдно для виявлення антитіл анти-НЛА, що зв'язують систему комплементу, використовується тест на лімфоцитотоксичність (ЛСТ, ЛЦТ). Цей тест найкраще виявляє антитіла, спрямовані проти антигенів НЛА класу I, але він менш чутливий до антитіл анти-НЛА класу II. Цей тест виявляє переважно імуноглобуліни класів IgM та IgG (підкласи IgG1, IgG3), проте не виявляє імуноглобулінів з підкласів IgG2, IgG4 та IgA. Принцип дії тесту полягає в тому, що лімфоцитотоксичні антитіла за участю системи комплементу пошкоджують клітинну оболонку лімфоцитів, що призводить до загибелі клітин; оболонка мертвих клітин пропускає барвник еозин, клітини стають більші, пласкі та не відбивають світла (позитивна реакція), тоді як живі клітини не поглинають барвника, вони лишаються маленькими і відбивають світло (негативна реакція).

#### 10.6.1.1. Спеціальне обладнання

Для виконання тесту необхідні:

- інвертований мікроскоп;
- мікросприци Гамільтона (або Роббінса) із вмістом 50  $\mu$ л та 250  $\mu$ л із дозаторами (одно- або шестиканальні);
- пластикові мікрокамери (тип Тerasaki).

#### 10.6.1.2. Реактиви

1. Рідина для виділення лімфоцитів з градієнтом густини 1,077 г/мл. Дозу 9,556 г фіколу розчинити у 134 мл дистильованої води, підігрітої до 90 °С. Коли охолоне до кімнатної температури, додати 20 мл 75% верографіну. Густина розчину має становити 1,077 г/мл. Розведений фікол можна поділити на порції та зберігати при температурі –25 °С. Після розмороження перед використанням рН довести до 6,8 за допомогою 1N NaOH.

**УВАГА!** Можна використовувати готові рідини для виділення лімфоцитів із густиною, зазначеною вище.

2. Система комплементу кролика, заморожена або ліофілізована.

**УВАГА!** Особливої уваги потребує дотримання правил роботи з комплементом: розчиняти ліофілізований комплемент необхідно дистильованою водою (рН 7,2–7,4) безпосередньо перед використанням, тримати впродовж використання на льоду. Слід обережно піпетувати розчин комплементу, уникаючи спінювання, яке знижує його активність. Термін придатності розчиненого ліофілізованого комплементу не перевищує 3 годин. Повторне заморожування комплементу для подальшого використання недопустиме (див. інструкцію виробника). Рідка система комплементу може зберігатися у замороженому вигляді за температури –25 °С. Кожна партія системи комплементу має спершу пройти вхідний контроль.

3. 38% формалін із рН 7,2 (рН треба довести до потрібного показника за допомогою 1N NaOH).

**УВАГА!** Можна використовувати готові реактиви, що містять суміш еозину та формаліну.

4. Парафінова олія.
5. Буферний розчин NaCl (PBS, буферний розчин 0,9% NaCl) із рН 7,2.
6. Антикоагулянт — 5% розчин Na<sub>2</sub>EDTA або K<sub>3</sub>EDTA у 0,9% NaCl.
7. (EDTA — етилендіамінтетраоцтова кислота.)

#### 10.6.1.3. Виділення лімфоцитів для тестування

1. Найкраще виділяти лімфоцити зі свіжої крові. Вимагається, щоб близько 95% становили живі лімфоцити без забруднень іншими клітинами, особливо гранулоцитами. Якщо виникає необхідність транспортування крові, то треба пильнувати, щоб кров було взято в умовах стерильності, найкраще до пробірок системи «vacutainer», та щоб транспортували її за кімнатної температури.

2. Кров може бути взята на гепарин (20 од. натрієвого гепарину на 1 мл крові), Na<sub>2</sub>EDTA або K<sub>3</sub>EDTA (1 мл 5% EDTA та 9 мл крові).

3. Кров слід центрифугувати протягом 10 хв. у режимі 1500 обертів на хв. (170 × g) і видалити з неї багату на тромбоцити плазму (тромбоцити з плазми можна використати для виявлення анти-тромбоцитарних антитіл, п. 10.6.2.1). Решту крові доповнити PBS до початкового об'єму та розвести в PBS у пропорції 1:1.

4. Розведену кров обережно нашарувати на рідину для виділення лімфоцитів у пропорції 1 частина рідини на 2 частини розведеної крові. Центрифугувати впродовж 10 хв. у режимі 1500 обертів на хв. (170 × g), а потім — у режимі 3000 обертів на хв. (700 × g).

5. Лімфоцити зібрати з інтерфазу, тобто кільця, розташованого між рідиною для виділення та плазмою. Клітини тричі відмити PBS, двічі центрифугуючи впродовж 5 хв. у режимі 1500 обертів на хв. (170 × g) та один раз — упродовж 5 хв. у режимі 2000 обертів на хв. (300 × g).

6. Осад лімфоцитів завісити у PBS та довести до концентрації  $2 \times 10^6$ /мл.

#### 10.6.1.4. Здійснення тестування

1. Пластикові камери треба відповідним чином підписати. Усі заглибини камери ретельно наповнити парафіновою олією. Під час наливання парафіну слід стежити, щоб не потрапляли бульбашки повітря.

2. До кожної із заглибин камери (під парафін) за допомогою мікрошприца Гамільтона ввести 1 мкл досліджуваної сироватки, сироватки з антитілами HLA (позитивний контроль), а також сироватки групи АВ без антитіл (негативний контроль). Щоразу, змінюючи сироватку, мікрошприц слід ретельно промивати PBS — близько 5 разів, щоб уникнути потрапляння сироватки з однієї заглибини камери до іншої. Найчастіше подальші етапи тестування здійснюють безпосередньо після введення сироваток, але камери із сироватками можна зберігати в холодильнику до 3 діб, а довше — у морозильнику протягом кількох місяців за температури  $-70^\circ\text{C}$ .

3. До сироваток додати по 1 мкл зависі лімфоцитів, виділених способом, наведеним у п. 10.6.1.3, та інкубувати протягом 30 хв. за температури (20–24) °C (найкраще у термостаті).

4. Додати 5 мкл системи комплементу та інкубувати протягом 60 хв. за температури (20–24) °C.

5. Додати 1 мкл 5% еозину, а через кілька хвилин — 5 мкл розчину формаліну.

**УВАГА!** Готові реактиви (суміш еозину та формаліну) додавати у тих кількостях, які рекомєндує виробник.

6. Результат аналізу виявити в інверсійному мікроскопі (збільшення об'єктива 10 ×, окуляра — 16 × або 12,5 ×), не раніше ніж через 30 хв. Найбільш достовірними є результати, які отримують наступного дня. Реакцію оцінюють за 8-бальною шкалою, враховуючи відсоток мертвих лімфоцитів у порівнянні з позитивним та негативним контролем (табл. 10.4).

**Інтерпретація результатів аналізів у тесті ЛЦТ**

Бали	% мертвих клітин	Інтерпретація тесту
1	до 10	Негативний
2	11–20	Сумнівно негативний
4	21–50	Слабо позитивний
6	51–80	Позитивний
8	81–100	Сильно позитивний
0		Для оцінювання не годиться

**10.6.1.5. Використання тесту ЛЦТ у дослідженнях****10.6.1.5.1. Виявлення лімфоцитотоксичних антитіл у сироватці багаторазових реципієнтів крові**

Для здійснення дослідження потрібна така кількість зависей лімфоцитів, щоб представлені були найпоширеніші антигени HLA (зазвичай достатньо 10 зависей лімфоцитів).

**10.6.1.5.2. Як застосовувати тест ЛЦТ щодо проби на сумісність**

Тест ЛЦТ, зорієнтований на пробу на сумісність, проводиться із сироваткою хворого та зависєю лімфоцитів донора КТ.

Визначення антигенів HLA класу I (локус A, B, C) лімфоцитів здійснюється за допомогою комплексу стандартних сироваток (по кілька сироваток даної специфічності). Такі комплекти виробляються багатьма фірмами і містять від 60 до 180 сироваток із різними специфічностями. Кожна фірма додає до тестових комплектів протоколи з описами діагностичних сироваток, а також ампулки із системою комплементу. Кожен антиген HLA-A, -B, -C має бути визначений за допомогою двох моноспецифічних сироваток або ж за допомогою трьох сироваток, які, окрім антитіл, спрямованих до даного антигену, містять також інші специфічні антитіла анти-HLA.

**10.6.2. Методи виявлення антитромбоцитарних антитіл**

Для виявлення антитромбоцитарних антитіл найчастіше застосовують методи, що базуються на антиглобуліновому тестуванні. Сироватку, у якій ми шукаємо антитіла, слід інкубувати з алогенними тромбоцитами, а потім з антиглобуліновою сироваткою, поєднаною з флюорохромом або ензимом. Якщо антиглобулінова сироватка:

- мічена флюоресцеїном (імуофлюоресцентний тест) — результати аналізів спостерігають у флюоресцентному мікроскопі або у проточному цитометрі;
- поєднана з ензимами: основною фосфатазою або пероксидазою (імуоензимний тест) — результати аналізів спостерігають у спектрофотометрі.

Існує можливість купівлі готових комплектів для ензимних тестів, які виробляють різні фірми, разом із необхідними реактивами та докладними правилами проведення аналізу. Нині на ринку доступні ензимні тести на мікрокамерах, оброблених:

- тромбоцитами (такий тест виявляє не тільки специфічні антитромбоцитарні антитіла, а й антитіла HLA);
- глікопротеїнами, виділеними з тромбоцитарних оболонок, наприклад, GPIIb/IIIa, GPIb або GPIa/IIa, які є носіями відповідних специфічних антигенів HPA (такий тест виявляє специфічні антитромбоцитарні антитіла).

**10.6.2.1. Імуофлюоресцентний тест із тромбоцитами — PIFT**

На протипагу вищеописаним ензимним тестам, комплекти для імуофлюоресцентних тестів із тромбоцитами (PIFT) не виробляються комерційними фірмами, тому нижче наведено правила виконання таких тестів.

**10.6.2.1.1. Спеціальне обладнання**

Для тестування необхідні:

- флюоресцентний мікроскоп або проточний цитометр;
- пластикові мікрокамери із круглодонними заглибинами (Falcon);
- центрифуга для центрифугування пластикових камер (утім, PIFT можна робити і в пробірках, і тоді така центрифуга не потрібна).

**10.6.2.1.2. Реактиви**

1. Концентрований буфер EDTA:
  - 31,25 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ;
  - 16,50 г  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ;
  - 45,0 г  $\text{NaCl}$ ;
  - $\text{H}_2\text{O}$  — до 500 мл (розчиняти в гарячому стані).
2. Розведений буфер EDTA (готується у день аналізу з концентрованого буфера EDTA):
  - 10 мл концентрованого буфера EDTA;
  - 90 мл  $\text{H}_2\text{O}$ ;
  - 1 мл 20% бичачого альбуміну;
  - довести до рН 7,2 за допомогою 3М  $\text{NaOH}$ .
3. Хлорид амонію для лізису еритроцитів:
  - 4,15 г  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ;
  - 0,5 г  $\text{KHCO}_3$ ;
  - 0,8 мл 5% EDTA;
  - $\text{H}_2\text{O}$  — до 500 мл.

Якщо результати аналізів планується спостерігати у цитофлюориметрі, виділені тромбоцити не обов'язково очищувати від еритроцитів шляхом лізису останніх за допомогою хлориду амонію.

4. Параформальдегід (для фіксації тромбоцитів) — 1% розчин у PBS.

5. Антиглобулінові сироватки, фрагмент  $\text{F}(\text{ab}')_2$ , сполучені з ізотіоціанатом флюоресцеїну (FITC), спрямовані проти людських глобулінів:  $\text{IgG}+\text{IgM}+\text{IgA}$  (поліспецифічних) або  $\text{IgG}$  чи  $\text{IgM}$  (моноспецифічних). Для кожної антиглобулінової сироватки слід установити відповідну міру розведення для тесту PIFT. Спираючись на показник розведення, рекомендований виробником (див. фірмову листівку), приготувати кілька розведень сироватки з показниками, вищими та нижчими за рекомендований. Для цієї мети слід застосувати сироватку з потужними антитромбоцитарними антитілами, а також сироватку групи АВ без антитіл (негативний контроль). Обрати таке найбільше розведення антиглобулінової сироватки, яке дає потужні реакції з антитромбоцитарними антитілами — за відсутності реакції із сироваткою без антитіл.

6. Рідина для заморожування тромбоцитів: буфер EDTA та DMSO у пропорції 10:1. (DMSO — диметилсульфоксид).

7. Рідина для розморожування тромбоцитів: змішати буфер EDTA та ACD у пропорції 10:1.

8. Хлорохін 20% із рН 4; розчин хлорохіну довести до потрібного рН за допомогою 5N  $\text{HCl}$ .

9. Антикоагулянт: 5%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  або  $\text{K}_3\text{EDTA}$  у 0,9%  $\text{NaCl}$ .

**10.6.2.1.3. Виділення тромбоцитів**

1. Кров, узятую з EDTA (1 мл EDTA та 9 мл крові), центрифугувати впродовж 10 хв. у режимі 1500 обертів на хв. ( $170 \times g$ ).

2. Зібрати багату на тромбоцити плазму та центрифугувати впродовж 5 хв. у режимі 3000 обертів на хв. ( $700 \times g$ ).

3. Осад тромбоцитів залити крижаною рідиною для лізису еритроцитів (1–2 мл) та інкубувати у льодовій бані від 5 до 10 хв. Цей етап проводиться у тому разі, якщо результати аналізів планується спостерігати у флюоресцентному мікроскопі.

4. Тромбоцити тричі відмивати розведеним буфером EDTA, центрифугуючи по 5 хв. у режимі 3000 обертів на хв. ( $700 \times g$ ).

5. До осаду тромбоцитів додати 2 мл 1% параформальдегіду та фіксувати клітини впродовж 5 хв. за температури 20–22 °C (для тесту PIFT можна також використовувати нефіксовані тромбоцити).

6. Тромбоцити відмити так само, як рекомендовано у п. 4, та довести до густини близько  $250 \times 10^6/\text{мл}$ .

#### 10.6.2.1.4. Приготування заморожених тромбоцитів

1. Тромбоцити, виділені способом, поданим у п. 10.6.2.1.3, розподілити по пробірках на порції (наприклад, по 200 мкл), після чого упродовж 10–15 хв. дуже повільно, по краплі, постійно струшуючи, додавати такий самий об'єм рідини для заморожування тромбоцитів. Пробірки заморозити за температури  $-196^\circ\text{C}$  (у рідкому азоті).

2. Перед виконанням тесту PIFT тромбоцити швидко розморозити і тричі відмити, застосовуючи рідину для розморожування тромбоцитів, після чого завісити їх у розведеному буфері EDTA і довести до потрібної густини.

#### 10.6.2.1.5. Приготування тромбоцитів з антигенами HLA, злущеними хлорохіном

Тромбоцити виділити способом, поданим у п. 10.6.2.1.3, але крім того (до фіксації параформальдегідом), до осаду тромбоцитів додати 1 мл 20% хлорохіну та інкубувати впродовж 20 хв. за температури ( $20-22^\circ\text{C}$ ), помішуючи клітини кожні 5 хв. Після триразового відмивання хлорохіну продовжувати подальші етапи виділення тромбоцитів, описані у п. 10.6.2.1.3.

#### 10.6.2.1.6. Відбір тромбоцитів для тестування

1. Для виявлення антитіл у сироватках реципієнтів багаторазових трансфузій крові достатньо буде виділити тромбоцити від двох донорів. Оскільки тест PIFT виявляє також антитіла HLA, то слід паралельно провести тест ЛЦТ з лімфоцитами від тих самих донорів крові, чиї тромбоцити будуть використані для тесту PIFT. Це потрібно для того, щоб зрозуміти, чим спричинена реактивність сироватки з тромбоцитами — чи антитілами HLA, чи специфічними антитромбоцитарними антитілами. Якщо у сироватці виявлено антитіла HLA, а ми маємо на меті ще виявити в ній антитіла HPA, тест PIFT можна провести із тромбоцитами, обробленими хлорохіном, який злущує антигени HLA з поверхні клітин.

2. Для виконання перехресної проби слід використовувати тромбоцити від донорів, КТ яких буде переливатися цьому хворому.

3. Якщо свіжовиділених тромбоцитів у розпорядженні немає, то для тесту PIFT можна також використовувати раніше заморожені тромбоцити.

#### 10.6.2.1.7. Здійснення тестування

1. До заглибин мікрокамери ввести по 30 мкл досліджуваних сироваток, 2–3 сироватки групи АВ без антитіл (негативний контроль), сироватку зі специфічними антитромбоцитарними антитілами анти-HPA 1a (позитивний контроль) і додати по 30 мкл виділених тромбоцитів. Мікрокамеру інкубувати впродовж 30 хвилин за температури  $37^\circ\text{C}$ .

2. Відмити мікрокамеру у такий спосіб: додати до заглибин по 200 мкл розведеного буфера EDTA та центрифугувати протягом 3 хв. у режимі 2500 обертів на хвилину ( $800 \times g$ ), якщо тест виконується на пластикових мікрокамерах, — або протягом 3 хв. у режимі 3000 обертів на хвилину ( $1100 \times g$ ), якщо тест виконується в пробірках. Відмивання повторити ще тричі. Після кожного центрифугування видалити надосадову рідину та висушити мікрокамеру на лігніні.

3. Додати 30 мкл відповідного розчину антиглобулінової сироватки, поєднаної з FITC. Мікрокамеру захистити від світла алюмінієвою фольгою та інкубувати протягом 30 хв. за температури ( $20-22^\circ\text{C}$ ), після чого тричі відмити, як описано вище в п. 2.

4. Після останнього відмивання видалити надосадову рідину із заглибин мікрокамери, але не висушувати на лігніні. Якщо результати аналізів планується спостерігати:

- у флюоресцентному мікроскопі — до кожної заглибини мікрокамери додати по краплині PBS із домішкою гліцерину (1 крапля гліцерину + 4 краплі PBS). Далі краплини зависі тромбоцитів перенести на предметне скло, накрити покривним склом і спостерігати в мікроскопі;
- у проточному цитофлюориметрі — з кожної заглибини мікрокамери перенести по 5 мкл осаду клітин до 1000 мкл розведеного буфера EDTA. Результати аналізу спостерігати того самого дня у цитофлюориметрі; у крайньому разі можна спостерігати результат наступного дня, але тоді мікрокамера має бути захищена від світла і зберігатися при температурі  $4^\circ\text{C}$ .

#### **10.6.2.1.8. Оцінка флюоресцентного тесту**

Оцінку флюоресцентного тесту можна здійснити:

- у мікроскопі (при збільшенні 400 ×). Реакція визнається позитивною, якщо наявне характерне світіння тромбоцитів (світла флюоресцентна облямівка навколо клітин); у разі негативної реакції світіння відсутнє. Інтенсивність світіння оцінюється за шкалою від 1+ до 4+;
- у проточному цитометрі (можуть бути проаналізовані від 5000 до 10 000 клітин). Результати тесту оцінюються на підставі кількості клітин, що світяться (відсоток, медіана чи т. зв. середній канал світіння — mean channel). Негативним результатом вважається реакція тромбоцитів із сироватками без антитіл (від донорів групи АВ). Якщо показник перевищує середній показник світіння негативного контролю  $\pm 3SD$  — результат позитивний.