

Abstract**G. Myronenko,****R. Pavliuk,***SI «Institute of Haematology
and Transfusiology of NAMS
of Ukraine»,**12 M. Berlinskogo str., Kyiv,
04060, Ukraine***THE PRINCIPLES OF IMMUNOGEMATOLOGICAL
DIAGNOSTICS AND RISK ASSESSMENT OF AUTOIMMUNE
HEMOLYSIS (ORIGINAL RESEARCHES)**

Introduction. The presence of antierythrocyte antibodies is one of the key elements in the diagnosis of autoimmune hemolytic anemia (AIHA). 80 % of AIHA are secondary (symptomatic) processes and they are a manifestation of underlying diseases (neoplasms, infections, lymphoproliferative disorders, autoimmune disorders, viral infections, immune deficiency states, medications and toxic effects). At the same time the traditional tests for the detection of antibodies (conglutination reaction with the adding of gelatin and Coombs test with polyspecific anti-globulin reagent) do not reveal the full range of antibodies which does not allow to form a sufficient clinician idea of the autoimmune nature of the hemolytic process and determine its activity for the prediction and optimization of patient's treatment. This is a basic element of AIHA diagnostics detection of antierythrocyte antibodies. Due to current achievements in immunohaematology it is a necessary additional examination of patients.

Purpose. The purpose of current research study was to demonstrate the diagnostic and prognostic value range of modern immunohematological tests to evaluate autoimmune hemolytic processes.

Materials and methods. During current research 67 patients with acquired hemolytic anemia with positive tests serum for erythrocyte autoantibodies and varying degrees of severity of clinical and laboratory signs of hemolytic process were examined. The hemolysis in 1/3 patients had the secondary (symptomatic) origin – as a complication of malignant diseases of the blood, pernicious anemia, systemic connective tissue diseases, infections, uncontrolled unauthorized medication, toxic effects. We used the gel test for identification of erythrocytic antibodies, classes, subclasses and determining their density on erythrocytes as well as bringing the complement system (BioRad, USA). The statistical analysis using the statistical software package StatSoft STATISTICA 10.0.1011(USA) was performed in the research.

Results and Discussion. The results of the immunohaematological study shows a serologic range of autoantibodies: warm-active agglutinins – 52,2 %, cold-active agglutinins – 25,4 %, mixed cold- and warm-active antibodies – 7,5 %, hemolysins – 14,9 %. High-density warm agglutinins IgG1/IgG3 on the surface of red blood cells were accompanied by the maximum activity of the immune destruction and caused a significant impact on the progression of anemia – in terms of hemoglobin ($p < 0,05$) and the number of red blood cells ($p < 0,01$). Wide thermal amplitude of cold agglutinins (4–32 °C) was more important for the progression of hemolysis than their high titer. The combination of warm agglutinins IgG, IgA, IgM appeared to combine with a poor prognosis for the course of hemolytic process.

Conclusions. Coombs test is only a primary link in the diagnosis of AIHA. Consequently, further serological blood testing for the detection of all variants antibodies for the purpose of future diagnosis is needed. It is necessary to determine the density of antibodies on the surface of red blood cells in the case of warm IgG-antibodies and intensity of Coombs test reaction (3+/4+) and to examine the thermal amplitude and titer in case of identification of cold agglutinins.

Keywords: Autoimmune hemolysis, agglutinins, hemolysins, the density of antibodies.

Corresponding author: immunogematolog@gmail.com

Резюме

Г. А. Мироненко,
Р. П. Павлюк,

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»,
вул. М. Берлінського, 12, Київ,
Україна, 04060

ПРИНЦИПИ ІМУНОГЕМАТОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА ОЦІНЮВАННЯ РИЗИКУ АУТОІМУННОГО ГЕМОЛІЗУ (ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Метою дослідження було продемонструвати діагностичну і прогностичну значущість спектра сучасних імуногематологічних тестів діагностики аутоімуних гемолітичних процесів.

Обстежено 67 хворих на набуту гемолітичну анемію з клініко-лабораторними ознаками гемолітичного процесу різного ступеня вираженості та позитивними тестами для виявлення аутоімуних антиеритроцитарних антитіл. У 1/3 пацієнтів гемоліз мав симптоматичне походження: ускладнення злоякісних новоутворень крові, системні захворювання, інфекції, приймання лікарських засобів, токсичні впливи. Антиеритроцитарні антитіла, їх ідентифікацію за класами, підкласами, щільність опсонізації ними еритроцитів, а також продукти деградації комплементу визначали у гелевому тесті (BioRad, USA). Статистичний аналіз здійснювали за допомогою пакета статистичних програм StatSoft STATISTICA 10.0.1011 (USA). Імуногематологічні тести виявили такий серологічний спектр антиеритроцитарних антитіл: неповні теплові аглютиніни – 52,2 %, холододі аглютиніни – 25,4 %, змішаний варіант – 7,5 %, гемолізину – 14,9 %. Висока щільність неповних теплових аглютининів IgG1/IgG3 на поверхні еритроцитів відповідала максимальній активності імунної деструкції та спричиняла достовірний вплив на прогресування анемічного синдрому – за показниками гемоглобіну ($p < 0,05$) та еритроцитів ($p < 0,01$). Розширення температурного діапазону дії повних холододі аглютининів (від 4 до 32 °C) мали більше значення для прогресування гемолітичного синдрому, ніж їхній титр. Комбінація теплових IgG, IgA, IgM була несприятливою прогностичною ознакою перебігу гемолітичного процесу.

Отже, проба Кумбса є лише скринінговою ланкою діагностики імунної гемолітичної анемії; у випадку маніфестації процесу для уточнення діагнозу є доцільним обстеження крові на наявність усіх серологічних варіантів антитіл. Для оцінювання ризику гемолізу при виявленні теплових антитіл класу IgG за інтенсивності реакції Кумбса (3+/4+) необхідно встановити щільність антитіл на поверхні еритроцитів, при ідентифікації холододі аглютининів – їх титр та температурний оптимум дії.

Ключові слова: аутоімуний гемоліз, аглютиніни, гемолізину, щільність антитіл.



Резюме

Г. А. Мироненко,

Р. П. Павлюк,

*ГУ «Институт гематологии и трансфузиологии НАМН Украины», ул. М. Берлинского, 12, Киев, Украина, 04060***ПРИНЦИПЫ ИММУНОГЕМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ РИСКА АУТОИММУННОГО ГЕМОЛИЗА (ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)**

Цель исследования – продемонстрировать диагностическую и прогностическую значимость спектра современных иммуногематологических тестов для диагностики аутоиммунных гемолитических процессов. Обследовано 67 больных с приобретенной гемолитической анемией и клинико-лабораторными признаками гемолитического процесса различной степени выраженности, а также положительными тестами для выявления аутоиммунных антиэритроцитарных антител. У 1/3 пациентов гемолиз имел симптоматическое происхождение – как осложнение злокачественных заболеваний крови, системных заболеваний, инфекций, приема лекарственных средств, токсических воздействий. Антиэритроцитарные антитела, их идентификацию по классам, подклассам, плотность опсонизации ими эритроцитов, а также продукты деградации комплемента определяли в гелевом тесте (BioRad, USA). Статистический анализ осуществляли с помощью пакета статистических программ StatSoft STATISTICA 10.0.1011 (USA). Иммуногематологические тесты выявили следующий серологический спектр антиэритроцитарных антител: неполные тепловые агглютинины – 52,2 %, холодовые агглютинины – 25,4 %, смешанный вариант – 7,5 %, гемолизины – 14,9 %. Высокая плотность неполных тепловых агглютининов IgG1/IgG3 на поверхности эритроцитов соответствовала максимальной активности иммунной деструкции и вызывала достоверное влияние на прогрессирование анемического синдрома – по показателям гемоглобина ($p < 0,05$) и эритроцитов ($p < 0,01$). Расширение температурного диапазона действия полных холодовых агглютининов (от 4 до 32 °С) имели большее значение для прогрессирования гемолитического синдрома, чем их титр. Комбинация тепловых IgG, IgA, IgM была неблагоприятным прогностическим признаком течения гемолитического процесса.

Таким образом, проба Кумбса является только скрининговым звеном диагностики иммунной гемолитической анемии. В случае манифестации процесса для уточнения диагноза целесообразно исследование крови на наличие всех серологических вариантов антител. Для оценки риска гемолиза при выявлении тепловых антител класса IgG при интенсивности реакции Кумбса (3+/4+) необходимо установить плотность антител на поверхности эритроцитов, а при идентификации холодовых агглютининов – их титр и температурный оптимум действия.

Ключевые слова: Аутоиммунный гемолиз, агглютинины, гемолизины, плотность антител.

Автор, відповідальний за листування: immunogematolog@gmail.com

Вступ

Аутоімунний гемолиз є ускладненням багатьох захворювань та станів, зокрема негематологічного профілю. Згідно з даними сучасних авторів близько 80 % аутоімунних гемолітичних анемії (АІГА) мають вторинний (симптоматич-

ний) характер та часто є маніфестацією основного захворювання [1, 2]. Окрім класичних нозологій, які найчастіше ускладнюються ГА (лімфопроліферативні новоутворення, В-12 та фолієводефіцитна анемія, системні захворювання сполучної тканини, злоякісні пухлини), привер-



тає увагу їх поширеність при інфекційних захворюваннях, таких як вірусні гепатити, ВІЛ, інфекційний мононуклеоз, цитомегаловірусна інфекція, весь спектр дитячих інфекційних хвороб. Особливо необхідно виділити аутоімунні гемолітичні процеси, які є ускладненням медикаментозної терапії. Відомими лікарськими засобами, що спричиняють гемоліз, є більше 150 одиниць, зокрема чимало загальнозживаних нерецептурних препаратів [3–5].

У діагностиці АІГА наявність антиеритроцитарних антитіл (АТ) є одним із ключових моментів. Проте традиційні тести для виявлення АТ – реакція конглютинації з додаванням желатину та проба Кумбса з поліспецифічним антиглобуліновим реагентом – не дозволяють виявити весь спектр можливих АТ, що не дає можливості достатньою мірою сформулювати уявлення лікаря-клініциста про аутоімунний характер гемолітичного процесу та його активність для прогнозу та оптимізації лікування пацієнта. Тому додаткове обстеження хворих із врахуванням сучасних досягнень імуногематології на сьогодні є необхідним [6, 7].

Мета дослідження. Продемонструвати діагностичну і прогностичну значущість спектра сучасних імуногематологічних тестів діагностики аутоімунних гемолітичних процесів.

Матеріали і методи дослідження. У дослідження включено 67 хворих на набуту ГА з різним ступенем вираженості клініко-лабораторних ознак гемолітичного процесу та позитивними тестами виявлення аутоімунних антиеритроцитарних антитіл. Пацієнти були обстежені у рамках НДР, які виконувалися в ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»: «Розроблення заходів профілактики імунологічних ускладнень при гемотрансфузійній терапії» (№ держреєстрації 0109U002629, термін виконання 2008–2011 рр.) та НДР «Вивчення механізмів імунного гемолізу при захворюваннях різного генезу» (№ держреєстрації 0113U000461, термін виконання 2013–2015 рр.). Під час планування робіт були одержані позитивні рішення комітету з медичної етики інституту щодо відповідності дотримання етичних стандартів у наукових дослідженнях з залученням людини, що відповідає принципу Гельсінської декларації «Етичні принципи медичних досліджень за участі людини як об'єкта дослідження», Конвенції Ради Європи про захист прав та гідності людини в зв'язку із застосуванням досягнень біології та медицини та відповід-

ним Законам України. Пацієнти, які були обстежені у рамках вищезазначених робіт, надали письмову інформовану згоду на участь у наукових клінічних дослідженнях (випробуваннях).

Ідіопатична форма АІГА (причину захворювання не встановлено) мала місце у 2/3 обстежених, у решті випадків спостерігали вторинний характер гемолізу (симптоматична АІГА, як гемолітичний компонент злоякісних захворювань крові, В-12 та фолієводефіцитної анемії, системних захворювань сполучної тканини, інфекцій, неконтрольованого приймання лікарських засобів (парацетамол, цефтріаксон), а також як наслідок впливу токсичних речовин – ацетону, анілінових барвників).

Для дослідження всього спектра АТ у кожного пацієнта використовували венозну кров, взятую натщесерце об'ємом 4 мл у суху пробірку (для отримання сироватки) та об'ємом 2 мл – на гепарині (для отримання еритроцитів, які потім тричі відмивали 0,9 % розчином хлориду натрію). Якщо при заборі крові наставала аглютинація еритроцитів (може свідчити про наявність холодних форм антитіл з високою температурною активністю АТ), то його повторювали, використовуючи підігріті шприц та пробірку. Зберігали кров для отримання згустку, а також транспортували її (за потреби) за температури 37 °С; відмивали еритроцити підігрітим до аналогічної температури розчином хлориду натрію. Для визначення аглютинінових форм антиеритроцитарних аутоАТ використовували ID-картки виробництва фірми BioRad, USA: LISS/Coombs (IgG + C3d) – для неповних теплових АТ у тестах Кумбса, NaCl, enzyme test and cold agglutinins – повних холодних аглютинінів, ідентифікацію АТ за класами проводили на ID-картках DC-Screening I, що визначають IgG, IgA, IgM та C3c, C3d компоненти комплементу [8].

Для визначення аутоімунних гемолізінів ми застосовували модифікований класичний метод їх виявлення, на що одержано відповідний патент [9]. Запропонований мікрометод полягає в мінімізації об'єму затратного матеріалу при збереженні суті та інформативності реакції. Це досягається шляхом зменшення об'єму компонентів реакції у 5 разів, застосуванням мікропробірок об'ємом 0,5 мл з витягнутим конусним дном для покращання сепарації осаду, м'якого режиму центрифугування для зменшення навантаження на клітинну мембрану.



Для дослідження брали 8 пробірок: 4 – для визначення теплових монофазних кислотних аутоімунних гемолізінів (1-й ряд) та 4 – для холододових (2-й ряд). Вміст та співвідношення реагуючих компонентів у пробірках 1-го та 2-го рядів ідентичні:

- у 1-шу пробірку вливають 100 мкл досліджуваної сироватки крові пацієнта та 10 мкл 1/3 N соляної кислоти;
- у 2-гу пробірку – 50 мкл досліджуваної сироватки крові пацієнта, 50 мкл одноступової свіжої сироватки донора як комплемент та 10 мкл 1/3 N соляної кислоти;
- у 3-тю пробірку – 100 мкл сироватки крові пацієнта;
- у 4-ту пробірку – 100 мкл одноступової свіжої сироватки донора як комплемент і 10 мкл 1/3 N соляної кислоти.

У кожну із 8 пробірок додавали по 10 мкл 30 % зависі тричі відмитих 0,9 % розчином NaCl еритроцитів досліджуваної особи. Перший ряд мікропробірок інкубували за температури 37 °C упродовж 60 хв, другий ряд – за температури 4 °C упродовж 30 хвилин, потім – за кімнатної температури (18–25 °C) упродовж ще 30 хв. Усі пробірки з сумішшю піддавали центрифугуванню упродовж 10 хв при обертанні ротора 1 000 об/хв. Оцінювали реакцію за наявності чи відсутності гемолізу в надосадовій рідині в пробірках:

1. Гемоліз відсутній у всіх пробірках – теплові (1-й ряд) та холододові (2-й ряд) монофазні кислотні гемолізини у сироватці крові пацієнта відсутні.

2. Гемоліз наявний у 1-й та 2-й пробірках, відсутній у 3-й та 4-й – монофазні кислотні теплові (1-й ряд) та холододові (2-й ряд) гемолізини у сироватці крові пацієнта.

3. Гемоліз наявний у 1-й пробірці, відсутній – у 2-й, 3-й, 4-й пробірках – наявність монофазних кислотних теплових та холододових гемолізінів у сироватці пацієнта і при слабкій активності комплементу у сироватці донора.

4. Гемоліз наявний у 2-й пробірці, відсутній – у 1-й, 3-й, 4-й пробірках – слабка активність комплементу у сироватці пацієнта, але наявність теплових (1-й ряд) та холододових (2-й ряд) гемолізінів.

Статистичний аналіз одержаних даних здійснювали за допомогою пакета статистичних програм StatSoft STATISTICA 10.0.1011. Для опису розподілень, які не є нормальними, використано елементи непараметричної статистики: міру центральної тенденції Me (медіана) та міру розсіювання (квартильний розмах). Для оцінювання достовірності розбіжностей кількісних ознак між двома незалежними групами застосовували непараметричний метод статистичного аналізу U-критерій Мана–Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення. У всіх хворих під час обстеження були виявлені аутоімунні антиеритроцитарні АТ – теплові, холододові аглютиніни або гемолізини. За характером виявлених АТ вони були поділені на три групи (табл. 1).

Таблиця 1 – Серологічні варіанти та особливості антиеритроцитарних антитіл у хворих з аутоімунним гемолізом

Показник	Тепловий аглютинін (n = 35)	Холододовий аглютинін (n = 17)	Змішаний тип (n = 5)	Гемолізін (n = 10)
Частота виявлення	52,2 %	25,4 %	7,5 %	14,9 %
Прямий антиглобуліновий тест	IgG ± C3d; рідко C3d	C3d; рідко C3c	IgG ± C3d/C3c	C3d
Ig	IgG1/IgG3, рідко з IgA чи IgM	IgM	IgG1/IgG3, IgM	IgG

Найчастіше у обстежених хворих (35 осіб) виявляли неповні теплові аутоімунні аглютиніни, що відповідає сучасним даним літератури [1, 6]. У них спостерігали такі лабораторні ознаки гемолізу: нормохромну анемію з ретикулоцитозом, підвищення рівня білірубину за рахунок

непрямої фракції, збільшення швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ), гіпергаммаглобулінемію, позитивну пряму пробу Кумбса, зниження осмотичної резистентності еритроцитів. Під час огляду: іктеричність склер, жовтяниця, збільшення розмірів печінки та селезінки. В анамне-



зі: гострий або підгострий перебіг з гарячкою, часто – зв'язок з інфекцією, інтоксикацією, наявність лімфопроліферативного захворювання, системного захворювання сполучної тканини, гепатиту.

Як правило, виявлені у хворих АТ були подані одним класом імуноглобулінів – IgG. У трьох хворих (з діагнозом «хвороба Вальденштрема, або В-клітинна хронічна лімфоцитарна лейкемія (В-ХЛЛ)») мала місце комбінація теплових аглютининів класів IgG, IgA, IgM, що виявилось несприятливою прогностичною ознакою – усі пацієнти померли.

Усім хворим з позитивною пробою Кумбса інтенсивністю 3+/4+ визначали підклас АТ, а також щільність опсонізації IgG1 та/або IgG3 еритроцитарної мембрани за їх наявності (для

оцінювання ризику гемолізу згідно з інструкцією виробника для відповідних ID-карток). У 18 пацієнтів діагностовано високий ризик гемолізу, що відповідало високій щільності покриття мембрани еритроцита АТ – вони проявлялись у розведенні 1:100 і відносились до IgG1- та/або IgG3-підкласів. У 8 пацієнтів виявлені АТ IgG1 та/або IgG3 у розведенні 1:1 (низька щільність), що свідчить про помірний ризик гемолізу (табл. 2). У решти хворих (переважно при гемобластозах) щільність АТ не встановлено через низьку інтенсивність проби Кумбса (1+/2+) або через її комплементарний тип (реакція позитивна за рахунок виявлення продуктів деградації комплекменту C3d- та/або C3c- феномен аутосенсibiliзації), у таких пацієнтів ступінь ризику гемолізу є мінімальним.

Таблиця 2 – Вплив щільності покриття тепловими аутоімунними аглютинінами поверхні еритроцитів на розвиток анемічного синдрому та вміст непрямого білірубину як показника екстраваскулярного гемолізу

Показник	Низький ризик гемолізу (n = 9)	Середній ризик гемолізу (n = 8)	Високий ризик гемолізу (n = 18)
Прямий антиглобуліновий тест з поліспецифічним АГС (IgG + C3d)	< 2 +	≥ 2 +	
IgG-IgA-IgM-C3c-C3d	< 2 + (IgG)	≥ 2 + (IgG), іноді в комбінації з IgM та IgA	
IgG у розведеннях 1:10–1:30–1:100–1:300–1:1000	= < 30	≥ 30	
IgG1/IgG3 IgG у розведеннях 1:1–1:100	Не виявляє	Позит. 1:1	Позит. 1:100
Hb – Me (25 %; 75 %), г/л	98 (79; 119)	100 (80; 120)	60 (44; 88)*
Eg – Me (25 %; 75 %), Т/л	3,1 (2,8; 3,9)	3,3 (2,4; 3,9)	1,5 (1,0; 2,8)**
Непрямий білірубин – Me (25 %; 75 %), мкмоль/л	12,6 (10,1; 27,0)	25,8 (12,8; 63,8) ***	55,5 (28,1; 90,0)*
* – $p < 0,05$ між 2-ю та 3-ю групами; ** – $p < 0,01$ між 2-ю та 3-ю групами; *** – $0,05 < p < 0,1$ між 1-ю та 2-ю групами			

Ми дослідили зв'язок між високою щільністю покриття еритроцитів аутоАТ і розвитком анемічного синдрому як прояву гемолізу (табл. 2). Такий зв'язок виявлено лише у групі хворих з високим ступенем ризику гемолізу (високою щільністю АТ) – встановлена достовірна різниця між 2-ю та 3-ю групами за показником гемоглобіну (Hb) ($p < 0,05$) та показником еритроцитів ($p < 0,01$). У сучасних наукових працях обережно трактують залежність інтенсивності гемолізу від щільності АТ на поверхні еритроцитів, спонукаючи не відкидати значення вираженості реакції аглютинації в класичному прямому антиглобуліновому тесті [6]. Оцінюючи наші

дані, ми взяли до уваги, що аутоімунний гемоліз у багатьох випадках був ускладненням основного захворювання (часто онкогематологічного), тому виникнення анемії насамперед провокувалося саме основним захворюванням, і лише критично висока концентрація АТ на еритроцитах виводила на перший план аутоімунний механізм гемолізу при прогресуванні анемічного синдрому.

У той самий час вміст непрямого білірубину як показник екстраваскулярного гемолізу більш чітко демонструє залежність інтенсивності деструкції еритроцитів від щільності АТ на мембрані (табл. 2). Так, простежується тенденція



щодо відмінності за цим показником між 1-ю та 2-ю групами спостереження ($0,05 < p < 0,1$) та знайдено достовірну відмінність між 2-ю та 3-ю групами ($p < 0,05$). Описаний показник ми пропонуємо враховувати під час оцінювання інтенсивності аутоімунного гемолізу саме при симптоматичних формах АГА з тепловими аглютинінами, коли є підстави вважати анемічний синдром багатофакторним.

У сироватці 17 досліджених зразків крові хворих на АГА виявлено аутоімунні холододі аглютиніни (ХА) (табл. 3). У трьох із них вияв-

лені АТ не були клінічно значущими – виявлялись у незначному титрі (1:2 і 1:8) при 4 °С, пряма проба Кумбса негативна, клініко-лабораторні ознаки гемолізу були відсутні. Ізольовані «патологічні» ХА спостерігали у 9 пацієнтів із хворобою холододі аглютинінів (ХХА), із них у 7 хворих – на фоні макроглобулінемії Вальденстрема, В-12 та фолієводефіцитної анемії, лімфом, пневмонії, інфекційного мононуклеозу, прийому медикаментів. Таке переважання симптоматичних форм ХХА над ідіопатичними є їх характерною рисою [10].

Таблиця 3 – Залежність рівня гемоглобіну від серологічної характеристики холододі аглютинінів

Холододі аглютинін	Клас Ig	Температурний діапазон дії	Титр	Прямий антиглобуліновий тест	Вміст Hb Me (25 %; 75 %), г/л
Клінічно незначущі (n = 3)	IgM	4 °С	1:2–1:8	Негативний	111,0 (109,0; 114,0)
Клінічно значущі (n = 9)		4–12 °С	1:64–1:4096	C3d, C3c або негативний	94,7 (90,0; 99,5)
		4–32 °С	1:2–1:512	C3d	71,0 (63,0; 78,0)*
Змішаний серологічний варіант (комбінація з тепловими АТ) (n = 5)	IgM + IgG	4–12 °С	1:4–1:256	C3d, IgG	51,5 (48,0; 58,0)**

* – $p = 0,02$ щодо групи хворих з ХА з вузьким температурним діапазоном дії АТ;
 ** – $p = 0,04$ щодо групи хворих з ХА з широким температурним діапазоном дії АТ

Різні автори декларують різні величини титрів, які можуть свідчити про клінічну значущість ХА (від 1:32 до 1:512), які певною мірою залежать від чутливості методу, що застосовується [11]. У нашому дослідженні клініко-лабораторні ознаки гемолізу виявлялися за температурного діапазону дії АТ 4–12 °С та титрі > 1:64 або діапазоні 4–32 °С і титрі > 1:2. Встановлена особливість ХА – з розширенням температурної амплітуди дії АТ їх титр у кожного пацієнта поступово зменшується: так, якщо за температури 4 °С титр АТ становив від 1:64 до 1:4096, то при 12, 22 та 32 °С – був дещо нижчим (від 1:2 до 1:512). У 7 обстежених пряма і непряма проби Кумбса були позитивними за рахунок C3d-компонента комплексу (комплементарний тип реакції), у двох – негативні. У цій групі хворих виявлено залежність клініко-лабораторних ознак гемолітичного процесу від титру та температурної активності ХА. Так, при низьких (1:64–1:256) титрах АТ і за низького

температурного оптимуму їх дії (4 °С) клінічні прояви внутрішньосудинного гемолізу мали епізодичний характер: переважно у вигляді синдрому Рейно і кропивниці у холодні періоди року. При вищих титрах АТ (1:512–1:1024) та більш широкому температурному діапазоні їх активності (до 32 °С) ознаки гемолізу були постійними і більш вираженими: відзначалася нормохромна анемія легкого, рідко середнього ступеня тяжкості, мали місце труднощі при підрахунку еритроцитів та ідентифікації групи крові через явище аутоаглютинації, що потребувало додаткових лабораторних заходів [12].

Ми виявили, що більш значущим для інтенсивності гемолізу, спровокованим холододі аглютинінами, був саме температурний діапазон активності АТ. Так, за низької концентрації, але за високої температурної активності АТ рівень гемоглобіну (Hb) був значно нижчим ($p = 0,02$), ніж при високій концентрації та за більш вузького температурного діапазону їх дії (табл. 3).



Фіксація АТ на еритроцитах відбувається за відносно низьких температур (при кровотоці через периферичні ділянки тіла, особливо в холодну пору року), проте активація комплементу можлива лише за більш високих температур (при поверненні крові в магістральні судини). Пентамірна структура IgM дозволяє системі комплементу ефективно активуватися за класичним шляхом (достатньо однієї молекули, зв'язаної з еритроцитарним антигеном) [1, 10]. За вузького температурного діапазону дії холодних АТ повернення крові у магістральні судини буде супроводжуватися їх швидким відділенням від еритроцитів, масштабна активація комплементу стане неможливою, тому руйнування еритроцитів буде незначним. Це, на нашу думку, пояснює, чому титр холодних АТ не є вирішальним для виникнення гемолізу порівняно із температурною амплітудою.

У хворих з інфекційними захворюваннями при агресивній медикаментозній терапії ми спостерігали транзиторні холодні АТ із відносно низьким титром та вузьким температурним діапазоном дії (через 3 тижні після одужання вони уже не проявлялись). У той самий час при ідіопатичній формі ХХА та фонових лімфопроліферативних захворюваннях титри АТ були більш високими, зазначені особливості описують також і інші автори [13].

У 5 пацієнтів виявлена комбінація неповних теплових (IgG) та холодних аглютининів (IgM) – змішаний серологічний варіант ГА. Прямі і непрямі проби Кумбса виявили теплові IgG- та C3d-компонент комплементу. Водночас спостерігали патологічні ХА із помірною температурною активністю: за температури 4 °С – у титрі від 1:64 до 1:256, при 12 °С – від 1:4 до 1:32. Клінічно ГА характеризувалася агресивним перебігом, із нашаруванням ознак внутрішньо- і позасудинного гемолізу, що проявлялося нормохромною анемією середнього або тяжкого ступеня тяжкості, ретикулоцитозом, підвищенням рівня непрямого білірубину, зниженням осмотичної резистентності еритроцитів, мав місце один летальний випадок. Рівень Нb у цих пацієнтів був достовірно нижчим ($p = 0,04$), ніж у випадках наявності ізольованих патологічних холодних АТ із широким температурним діапа-

зоном дії. ГА у вищеписаних хворих мала симптоматичний характер: була медикаментозно-індукована або як ускладнення хвороби Вальден-стрема і В-ХЛЛ. Сучасні наукові публікації наголошують на інтенсивному характері гемолізу, спричиненого такою комбінацією АТ та необхідності виявлення фонових захворювань [14].

У 14,9 % хворих аутоімунний гемоліз був зумовлений гемолізиновими формами АТ, переважно їх тепловим варіантом. У всіх випадках це явище виникало як ускладнення основного захворювання, переважно на фоні злоякісних захворювань крові: В-ХЛЛ, В-клітинної неходжкінської лімфоми, В-клітинної гострої лімфобластної лейкемії. Показники Нb та вмісту еритроцитів коливались від норми до анемії середнього ступеня тяжкості. Так, середній рівень Нb – Ме (25 %; 75 %) становив 101,0 (78,0; 134,0) г/л, еритроцитів – 3,40 (2,62; 4,32) Т/л. Лабораторні дані свідчать про інтраваскулярний варіант гемолізу – вміст гаптоглобіну в усіх випадках був нижчим від вікових норм, рівень вільного Нb – підвищений до 0,37 (0,13; 0,71) г/л, тоді як рівень непрямого білірубину не перевищував нормальних показників. Проба Кумбса була позитивною в одному випадку – за рахунок виявлення C3d-компонента комплементу.

Такий серологічний варіант АІГА часто зникає з поля зору клініциста, оскільки традиційний антиглобуліновий тест не виявляє гемолізинових форм АТ [1], тому є необхідність в спеціальних громіздких реакціях, які в класичному варіанті залучують значну кількість реагентів та крові пацієнта (близько 6–7 мл). Тому ми розробили мікрометод виявлення цього серологічного різновиду АТ [9].

Затверджені в Україні клінічні протоколи надання медичної допомоги хворим на АІГА обов'язковим елементом передбачають лише пряму пробу Кумбса, проте деталізація імунологічного обстеження допоможе ідентифікувати серологічний варіант АТ, оцінити ризик гемолізу, враховуючи їх характеристики, а також згідно із сучасними досягненнями, провести адекватне лікування [1, 10, 14, 15]. Такого роду дослідження в Україні на цей час можливі лише в окремих вузькопрофільних лабораторіях.

го процесу для уточнення діагнозу є доцільним дообстеження сироватки крові на наявність теплових, холодних аглютининів та гемолізинів.

Висновки

1. Проба Кумбса є лише первинною, скринінговою ланкою діагностики аутоімунної ГА. У випадку маніфестації гемолітично-



2. Для оцінювання ризику гемолізу під час виявлення теплових антитіл класу IgG за інтенсивності реакції Кумбса (3 + і 4+) необхідно встановити щільність АТ на поверхні еритроцитів.

3. При симптоматичних формах АІГА оцінювання ролі аутоімунного гемолітичного компонента у прогресуванні анемічного синдрому є ускладненою та потребує комплексного підходу.

4. Комбінація теплових IgG, IgA, IgM є несприятливою прогностичною ознакою перебігу гемолітичного процесу.

5. Для обрання клінічної тактики, прогнозування перебігу ХХА мають значення титр та температура активності АТ.

6. Транзиторне підвищення рівня холодо-

вих аглютининів у вузькому температурному діапазоні характеризує варіант медикаментозно-індукованої та постінфекційної ХХА, яка має епізодичний характер.

7. Найбільш виражені клініко-лабораторні ознаки гемолізу притаманні комбінованому серологічному варіанту АІГА та у разі широкого (від 4 до 32 °С) температурного діапазону активності ізольованих холодних АТ.

8. Феномен аутоенсибілізації за відсутності клінічних проявів гемолітичного процесу найчастіше спостерігається у хворих з гемобластозами і характеризується наявністю слідових кількостей АТ та компонентів комплекта.

References (список літератури)

- Greer JP, Arber DA., Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodgers GM [editors]. *Wintrobe's clinical hematology*. 13th edition. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS Publ., 2014. pp. 746-808.
- Guseva SA, Goncharov YaP. [Autoimmune hemolytic anemia: diagnosis and treatment (lecture)]. *Ukrainian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2012; 1: 34-50.
- Arndt PA, Leger RM, Garratty G, Arndt PA. Serologic characteristics of ceftriaxone antibodies in 25 patients with drug-induced immune hemolytic anemia. *Transfusion*. 2012; 52(3): 602-612.
- Leger RM, Garratty G. Antibodies to oxaliplatin, a chemotherapeutic, are found in plasma of healthy blood donors. *Transfusion*. 2011; 51(8): 1740-1744.
- Arndt PA, Garratty G, Wolf CF, Rivera M. Haemolytic anaemia and renal failure associated with antibodies to trimethoprim and sulfamethoxazole. *Transfus. Med.* 2011; 21(3): 194-198.
- Lai M, Leone G, Landolfi R. Autoimmune hemolytic anemia with gel-based immunohematology tests. *Am. J. Clin. Pathol.* 2013; 139(4): 457-463.
- Lai M, De Stefano V, Landolfi R. Haemoglobin levels in autoimmune haemolytic anaemias at diagnosis: relationship with immunoproteins on red blood cells. *Immunol. Res.* 2014; 60(1): 127-131.
- Mineyeva NV. *Grupy krovi cheloveka. Osnovy immunogematologii*. 2nd edition. [Human blood groups. Basics of immunohematology]. SPb.: A-print Publ., 2010. 188 p.
- Pavliuk RP, Tymoshenko UV, Myronenko GA, Lavrovska LN, inventors. *Sposib vyznachennya monofasnykh autoimunnykh kyslotnykh teplovykh ta kholodovykh hemolizyniv mikrometodom* [Micromethod for determining the monophasic autoimmune acid heat and cold hemolysins]. Ukrainian patent, no.99298, 2015.
- Swiecicki PL, Hegerova LT, Gertz MA. Cold agglutinin disease. *Blood*. 2013;122(7):1114-1121. Retrieved from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-02-474437>.
- Berentsen S, Tjønnfjord GE. Diagnosis and treatment of cold agglutinin mediated autoimmune hemolytic anemia. *Blood. Rev.* 2012;26(3):107-115. doi: 10.1016/j.blre.2012.01.002.
- Tymchenko AS, Yavorskyi VV, Maligon OI. *Natsionalne kerivnytstvo z vyrobnychoi transfuziologii dlya zakladiv, pidrozdiliv ta laboratory sluzhby krovi* [National guidelines on the production of transfusion for institutions, departments and laboratories blood service]. Kharkiv: Zoloti storinki Publ., 2015. 335 p.
- Chaudhary RK, Sudipta Sekhar Das. Autoimmune hemolytic anemia: From lab to bedside. *Asian J. Transfus Sci.* 2014; 8(1): 5–12. doi: 10.4103/0973-6247.126681.



14. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, Radice T, Nichele I, Di Bona E, Lunghi M, Tassinari C, Alfinito F, Ferrari A, Leporace AP, Niscola P, Carpenedo M, Boschetti C, Revelli N, Maria MA, Consonni D, Scaramucci L, De Fabritiis P, Tagariello G, Gaidano G, Rodeghiero F, Cortelezzi A, Zanella A. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: a GIMEMA study of 308 patients. *Blood*. 2014; 124(19): 2930-2936. doi: 10.1182/blood-2014-06-583021.
15. Bodivit G, Bensussan A, Fournie J, Yamada K, Copie-Bergman C, Bodivit G, Bensussan A, Fournie JJ, Godeau B, Bierling P, Izui S. IgA-mediated human autoimmune hemolytic anemia as a result of hemagglutination in the spleen, but independently of complement activation and Fc-RI. *Blood*. 2010; 116(20): 4141-4147.

(received 15.02.2016, published online 28.03.2016)

(одержано 15.02.2016, опубліковано 28.03.2016)

