

ТИПИРОВАНИЕ АНТИГЕНОВ ТРОМБОЦИТОВ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Минеева Н.В., Ёлов А.А., Бурыйлёв В.В., Гавровская С.В., Чеботкевич В.Н.

ФГУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА РФ; 191024,

Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16; факс: 717-25-50; 274-92-27; E-mail:

RNIHT@mail.ru

Резюме Для типирования антигенов тромбоцитов создана тест-система с использованием ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами на нуклеотидные замены, определяющие а- и b-аллели генов тромбоцитарных антигенов. Тест-система опробована на 161 образцах крови доноров. В результате типирования антигенов тромбоцитов классов НРА 1-5, 15 оценена распространенность антигенов тромбоцитов, которая в основном соответствовала таковой для жителей Европы по данным литературы. Эффективность использования предложенной тест-системы подтверждена также для диагностики конфликтов мать-плод по антигенам тромбоцитов при анализе образцов крови пациентов – родителей и их детей с признаками тромбоцитопении в анамнезе. Для выявления вероятности сенсибилизации женщин к тромбоцитам мужа при беременности проводили ПЦР-типирование антигенов 17 семейных пар, а также исследование аллоантител у женщин к тромбоцитам мужа. У 14 супружеских пар выявлены расхождения по антигенам тромбоцитов и у 5 женщин обнаружены аллоантитела к тромбоцитам, выработавшиеся в период беременности. В 3 случаях была установлена специфичность аллоантител, вызвавших иммунологический конфликт, послуживший причиной тромбоцитопении у детей, родившихся впоследствии. Используемый метод ПЦР в реальном времени более простой и дешевый по сравнению с ПЦР-типированием в геле с импортными реактивами. Результаты типирования, полученные при использовании предложенной тест-системы, совпадали с результатами типирования при применении коммерческой тест-системы импортного производства («PROTRANS», Германия).

Ключевые слова: тромбоцитарные антигены, тромбоцитопения, флуоресцентные зонды.

REAL-TIME PCR PLATELET ANTIGEN-TYPING OF DONORS AND PATIENTS

Mineeva N.V., Yolov A.A., Burylev V.V., Gavrovskaya S.V., Chebotkevich V.N.

Institute of Hematology and Transfusiology, 2-nd Sovetskaya, 16, St. Petersburg, 191024, Russia, fax: 717-25-50; 274-92-27; E-mail: RNIHT@mail.ru

Summary The real-time PCR – based test-system using the fluorescent probes on SNP determining the a- and b-alleles of HPA-1, -2, -3, -4, -5 and -15 gens is created and proposed. The system was tested on the 161 blood donor samples. Prevalence of platelet antigens was estimated after typing of HPA 1-5, 15 antigens. It answered the prevalence of the same antigens among European residents, according to literature data. The latest tests supported the efficiency of the proposed system for detection of mother-fetus conflicts for the children with thrombocytopenia symptoms in anamnesis. Platelet PCR typing was performed in 17 married couples, the alloantibody testing has also been performed on women sera using platelets of husband. Platelet antigens divergences were detected in 14 married couples. Alloantibodies to husband's platelet antigens, which had been produced during pregnancy, were detected in 5 women. Specificity of alloantibodies was confirmed in 3 cases. It was anti-HPA-3b; anti-HPA-3b,-5b and anti-HPA-1a,-3a,-15b alloantibodies. These alloantibodies had induced immune conflict, and caused the thrombocytopenia in further born children. Used real-time PCR is easier and cheaper than PCR gel-typing using import test-reagents. The results obtained with the proposed system are identical to the ones obtained with PROTRANS HPA Domino System (Germany).

Key word: platelet antigens, thrombocytopenia, fluorescent probes.

Введение

В последние годы значительно возросла потребность в трансфузиях тромбоцитов. Однако на практике у больных часто наблюдается отсутствие клинического эффекта и прироста числа тромбоцитов. Одной из причин этого является несовместимость донора и реципиента по антигенам тромбоцитов (HPA) [1]. К настоящему времени описано шесть основных систем антигенов тромбоцитов человека (HPA1-5,15) и несколько редко встречающихся антигенов, которые кодируются генами, различающимися между собой заменой одного нуклеотида в ДНК. Замена нуклеотида приводит к замещению одной аминокислоты на другую в полипептидной цепи при синтезе антигена, в результате чего обеспечивается разнообразие антигенов тромбоцитов [2,3,4].

Целесообразность типирования антигенов тромбоцитов для подбора совместимых пар донор-реципиент отмечается в ряде зарубежных и отечественных публикаций [5,6].

Кроме того, исследование антигенов тромбоцитов необходимо при диагностике иммунологических конфликтов мать-плод и тромбоцитопении новорожденных [7,8].

Учитывая определенные трудности типирования тромбоцитарных антигенов изосерологическими методами, в последние годы все чаще с этой целью применяются молекулярно-генетические методы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР) [9]. Однако в России для генотипирования тромбоцитов в настоящее время зарегистрирована только одна тест-система – PROTRANS HPA Domino System (Германия). Широкое использование этой тест-системы для типирования тромбоцитов в повседневной практике лабораторий затруднено вследствие трудоемкости проведения электрофореза для оценки конечного результата реакции. Применение ПЦР в реальном времени позволяет значительно упростить процесс и сократить время исследования [10,11].

Для типирования антигенов тромбоцитов нами представлена тест-система на основе метода ПЦР в реальном времени [12]. В основе ее действия лежит известный процесс детекции продукта ПЦР с использованием зонда типа TaqMan, содержащего на одном конце флуорофор, на другом – гаситель его флуоресценции. Расщепление этого зонда вследствие 5'-нуклеазной активности Taq-полимеразы приводит к разделению флуорофора и гасителя и соответственно флуоресцентному сигналу. Кроме того в представленной тест-системе для повышения специфичности действия зондов использованы также замковые нуклеотидные звенья (LNA – locked nucleic acids), что позволяет повысить специфичность обнаружения точечных нуклеотидных замен [13]. В плане подготовки тест-системы к регистрации в России нами проводилась ее апробация для типирования антигенов тромбоцитов.

Цель исследования: Оценка эффективности использования тест-системы для ПЦР типирования антигенов тромбоцитов доноров, а также супружеских пар для диагностики несовместимости мать-плод.

Материалы и методы

В работе использованы образцы крови 161 донора Санкт-Петербурга и Москвы, а также 17 супружеских пар и 3 детей, полученные из ЛПУ Санкт-Петербурга.

Выделение ДНК проводили из осадка лейкоцитов обработкой протеиназой К после осмотического лизиса эритроцитов. Объем образца крови составлял 300 мкл, конечный объем препарата ДНК составлял 200 мкл.

Определяли следующие генотипы: HPA-1, -2, -3, -4, -5, -15.

В состав тест-системы входят три амплификационных реагента, каждый содержит праймеры и зонды с разными флуорофорами на два гена и их а- и b- аллели, дезоксинуклеозидтрифосфаты и амплификационный буфер с ферментом Taq-полимеразой (АБТ). ПЦР типирование указанных антигенов проводилось в трех пробирках, первая пробирка содержала реагенты для типирования антигенов HPA-1 и 15, вторая – HPA-2 и -5, третья – HPA-3 и -4. Для ПЦР анализа одного образца ДНК смешивали 10 мкл амплификационного реагента, 30 мкл АБТ и 2-5 мкл препарата ДНК.

При оценке эффективности использования тест-системы для диагностики редко встречающихся гомозиготных генотипов HPA-4b, -15b нами были приготовлены синтетические аналоги ДНК. Праймеры и зонды для ПЦР были синтезированы в НПФ «Синтол» (Москва).

ПЦР в реальном времени проводилась на 4-канальном детектирующем термоциклере АНК-32 (НПФ «Синтол», Россия) по следующей программе: 2 мин при 94 °С, далее 45 циклов 15 сек при 94 °С и 30 сек при 60 °С. Прибор регистрирует интенсивность флуоресценции, которая обусловлена гибридизацией зондов с соответствующим участком ДНК.

Аллоантитела к антигенам тромбоцитов исследовали методом твердофазной адгезии на плашках в нашей модификации. Отмытые тромбоциты новорожденного или отца ребенка инкубировали с сывороткой матери. После отмывания для визуализации результатов реакции к тромбоцитам добавляли тест-эритроциты, покрытые анти-IgG антителами и центрифугировали. При положительном результате тест-эритроциты ровным слоем распределялись по ячейке. При отрицательном результате эритроциты образовывали осадок в виде точки на дне ячейки [14].

Полученные результаты

При проведении ПЦР на аппарате АНК-32 аллели а и b генов HPA-1, -4, -5 определяются в каналах ROX – Cy5. Аллели а и b генов HPA-2, -3, -15 определяются на каналах FAM – R6G. Образцы ДНК, гомозиготные по какому-либо антигену HPA (aa- или bb-аллели), дают сигнал в одном из двух каналов флуориметрии, а гетерозиготные ab-аллели – в двух каналах одновременно. При наличии аллеля в исследуемой ДНК, в соответствующем канале регистрации появляется специфический S-образный сигнал, отражающий повышение уровня свечения. При отсутствии аллеля, повышения уровня свечения не происходит или оно незначительное. В таблице 1 приведена схема

интерпретации результатов ПЦР типирования НРА, в зависимости от получения флуоресцентного сигнала в каналах прибора.

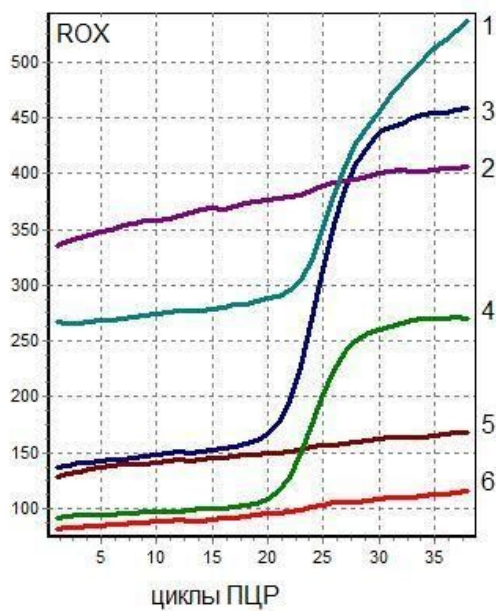
Таблица 1. Сигналы ПЦР типирования НРА в реальном времени на аппарате АНК-32

Амплифика ционный реагент	Определяемые генотипы НРА	Сигналы в каналах прибора		Определяемые генотипы НРА	Сигналы в каналах прибора	
		ROX	Cy5		FAM	R6G
Пробирка 1 aHP1-15	1aa	-	+	15aa	+	-
	1bb	+	-	15bb	-	+
	1ab	+	+	15ab	+	+
Пробирка 2 aHP2-5	5aa	-	+	2aa	-	+
	5bb	+	-	2bb	+	-
	5ab	+	+	2ab	+	+
Пробирка 3 aHP3-4	4aa	-	+	3aa	-	+
	4bb	+	-	3bb	+	-
	4ab	+	+	3ab	+	+

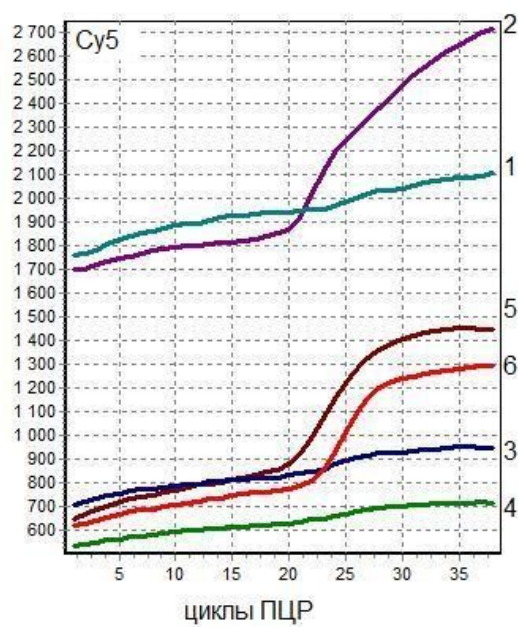
Примечание: плюс - наличие сигнала флуоресценции, минус - отсутствие сигнала флуоресценции.

Примеры сигналов, полученные при типировании образцов ДНК, содержащих разные гены тромбоцитов, приведены на рис.1.

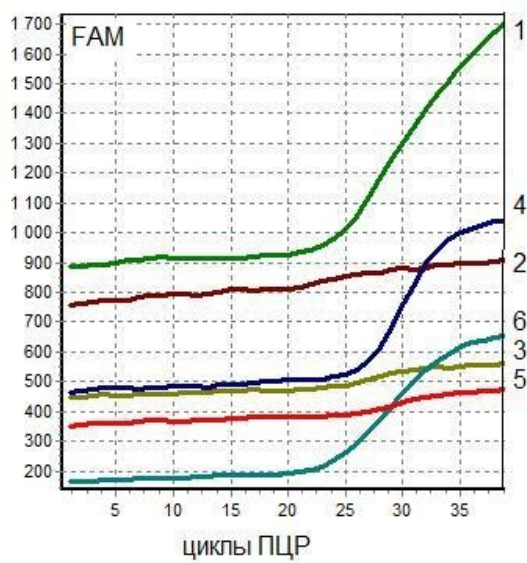
А



Б



В



Г

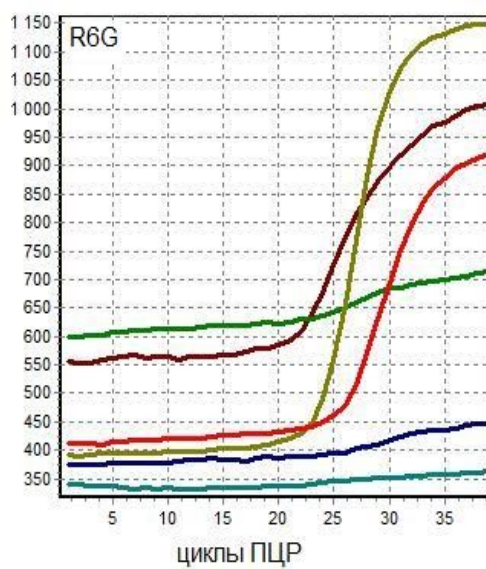


Рисунок 1. Флуоресцентные сигналы разных генов НРА – кривые накопления продуктов ПЦР в реальном времени. По оси X – число циклов ПЦР, по оси Y – интенсивность флуоресценции в условных единицах

А-Б – сигналы образцов ДНК в каналах ROX – Cy5: генотип НРА-5bb – положительный сигнал в канале ROX, отрицательный в канале Cy5 (1); генотип 5aa – отрицательный сигнал в канале ROX, положительный в канале Cy5 (2); генотип 4bb – положительный сигнал в канале ROX, отрицательный в канале Cy5 (3); генотип 1bb – положительный сигнал в канале ROX, отрицательный в канале Cy5 (4); генотип 4aa – отрицательный сигнал в канале ROX, положительный в канале Cy5 (5); генотип 1aa – отрицательный сигнал в канале ROX, положительный в канале Cy5 (6).

В-Г – сигналы образцов ДНК каналах FAM – R6G: генотип НРА-15aa – положительный сигнал в канале FAM, отрицательный сигнал в канале R6G (1); генотип 15bb – положительный сигнал в канале R6G, отрицательный сигнал в канале FAM (2); генотип 2aa – отрицательный сигнал в канале FAM, положительный сигнал в канале R6G (3); генотип 2bb – положительный сигнал в канале FAM, отрицательный сигнал в канале R6G (4); генотип 3aa – отрицательный сигнал в канале FAM, положительный сигнал в канале R6G (5); генотип 3bb – положительный сигнал в канале FAM, отрицательный сигнал в канале R6G (6).

Кроме АНК-32, тест-система была успешно опробована также на аппаратах ДТ-96 (ДНК-технология, Россия), Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия), iCycler iQ4 и iQ5 (Bio-Rad, США).

Полученные нами результаты типирования тромбоцитарных генов совпадали с данными типирования, полученными с применением коммерческой тест-системы «PROTRANS» (Германия).

Анализ распространенности различных форм антигенов НРА, в данной работе был проведен на 161 образце крови. Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Распространенность антигенов НРА среди доноров и пациентов

Генотип	Число образцов крови с разными генотипами (доля в %)					
	НРА-1	НРА-2	НРА-3	НРА-4	НРА-5	НРА-15
aa	133 (82%)	135 (83%)	66 (41%)	161 (100%)	147 (91%)	47 (29%)

ab	20 (12%)	24 (15%)	79 (49%)	0	14 (9%)	76 (44%)
bb	8 (6%)	2 (2%)	16 (10%)	0	0	38 (27%)

Полученные результаты в целом соответствуют распространению этих антигенов в Европе и результатам ранее проводившихся исследований [15,17]. Однозначное определение редких аллелей HPA-4bb, -5bb, не обнаруженных в обследованных образцах крови, было продемонстрировано с помощью синтетических конструкций.

Несовместимость по антигенам тромбоцитов, как уже отмечалось, может быть причиной не только неэффективности переливания тромбоцитов, но и аллосенсибилизации женщин к антигенам плода при беременности, что приводит к развитию у новорожденных неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении. Поэтому представляемая тест-система была оценена также с точки зрения возможности её использования для диагностики неонатальной тромбоцитопении, обусловленной несовместимостью мать-плод по антигенам тромбоцитов. Для выявления вероятности сенсибилизации женщин к антигенам тромбоцитов мужа при беременности, проводили ПЦР типирование антигенов семейных пар. Обследовано 17 беременных женщин и их мужей. Одинаковый или совместимый с мужем фенотип антигенов тромбоцитов имели 3 женщины. У 14 супружеских пар выявлены расхождения по антигенам тромбоцитов, в результате чего у женщин при беременности вероятно выработка антител к следующим антигенам: 1a,3a,15b; 2b,5b,15b; 3a; 3a,15b; 3b,5b; 3b,15a; 5b; 15b – по одному случаю, 3b- в четырех случаях, и в двух случаях возможна сенсибилизация к антигену 5a (при условии наследования детьми антигенов мужа, отсутствующих у матери).

Проведенное нами исследование аллоантител к тромбоцитам показало, что к моменту наблюдения пять женщин из 14 были сенсибилизированы, о чем свидетельствовала положительная реакция сывороток женщин с тромбоцитами мужа. Девяти женщинам, у которых антитела на момент исследования отсутствовали, рекомендовано повторное исследование антител к тромбоцитам в последнем триместре беременности.

Приводим описание случаев, в которых у матерей были обнаружены аллоантитела к тромбоцитам отца ребенка и установлена специфичность аллоантител, вызвавших иммунологический конфликт, послуживший причиной тромбоцитопении новорожденного.

Случай 1. Пациентка С., имеет в анамнезе две беременности, закончившиеся внутриутробной смертью плода. При исследовании сыворотки женщины с тромбоцитами мужа выявлены аллоантитела. Результаты проведенного генотипирования супружеской пары выявили совпадение по всем локусам, за исключением НРА-3, у мужа на тромбоцитах присутствовал антиген НРА-3b, отсутствующий у женщины (результаты типирования приведены в таблице 3). Вероятно антитела матери имеют специфичность анти-НРА-3b, что могло стать причиной гибели плодов.

Случай 2. Пациентка Л. Роды от первой беременности, протекавшей без патологии. У ребенка через месяц после рождения выявлена тромбоцитопения, количество тромбоцитов составило $10 \times 10^9/\text{л}$. Исследование сыворотки матери с тромбоцитами мужа выявило присутствие антитромбоцитарных аллоантител. Результаты генотипирования матери и отца выявили несовместимость по антигенам НРА-3b,-5b (таблица 3).

В связи с объективными трудностями получения на исследование образца крови новорожденного, исследование аллоантител матери с тромбоцитами ребенка было проведено только в одном случае.

Случай 3. Новорожденный 3. На 2-й день жизни развилась тромбоцитопения, количество тромбоцитов составило $30-10 \times 10^9/\text{л}$, кровоподтеки, петехиальная сыпь. Исследование фенотипа НРА проведено на образцах крови матери и ребенка. Результаты генотипирования матери и ребенка выявили несовместимость по антигенам НРА-1a,-3a,-15b. В сыворотке матери выявлены антитела к тромбоцитам ребенка.

Таблица 3. Результаты типирования антигенов тромбоцитов с применением ПЦР при диагностике несовместимости мать-плод по антигенам тромбоцитов

		НРА- 1	НРА- 2	НРА- 3	НРА- 4	НРА- 5	НРА- 15	Несовмес- тимость по антигенам
Случай 1	Мать	aa	aa	aa	aa	aa	Ab	3 b
	Отец	aa	aa	ab	aa	aa	Aa	
Случай 2	Мать	ab	aa	aa	aa	aa	Ab	3b,5b
	Отец	aa	aa	ab	aa	ab	Bb	
Случай 3	Мать	bb	aa	bb	aa	ab	Aa	1a,3a,15b
	Ребенок	ab	aa	aa	aa	aa	Ab	

На основании проведенных нами исследований новорожденному поставлен диагноз аллоиммунная тромбоцитопения и проведено соответствующее лечение.

Обсуждение

В последнее десятилетие значительное внимание исследователей привлечено к выявлению причин возникновения ряда тромбоцитопенических состояний и рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов. В связи с этим активно разрабатываются методы диагностики тромбоцитарных антигенов и антител. Наличие широких возможностей типирования антигенов тромбоцитов с помощью молекулярно-генетических методов на основе ПЦР создает новый подход в диагностике тромбоцитопений и обеспечении подбора пар донор-реципиент при трансфузиях тромбоцитов, а также исследований иммунологических конфликтов мать-плод по антигенам тромбоцитов. Наиболее перспективным для использования в повседневной практике является метод ПЦР в реальном времени.

Нами предложена тест-система для типирования антигенов тромбоцитов ПЦР в реальном времени, а также проведена оценка эффективности ее использования для выявления антигенов тромбоцитов доноров и реципиентов. Было показано, что частота встречаемости антигенов тромбоцитов у доноров с использованием предлагаемой тест-системы была сходна с приведенной в литературе. Проведенное обследование 17 супружеских пар позволило выявить группу женщин, у которых высока вероятность выработки антител к антигенам тромбоцитов при беременности. Кроме того, типирование антигенов тромбоцитов матери и новорожденного, в дополнение с выявлением

антитромбоцитарных антител, позволило нам установить причину тромбоцитопении у ребенка.

Выводы

На основании проведенных нами исследований показана эффективность применения представленной тест-системы, а также возможность ее применения на всех зарегистрированных в России детектирующих термоциклерах. Простота и достоверность диагностики антигенов тромбоцитов дает возможность широкого использования предлагаемой нами тест-системы в практическом здравоохранении.

Литература

1. Norton, A. Review: Platelet alloantigen and antibodies and their clinical significance/ A. Norton, D. Allen, M. Murphy//Immunohematology.-2004.-20.-v.2.-P.89-102.
2. Зотиков, Е.А. Тромбоциты и антитромбоцитарные антитела/ Е.А. Зотиков, А.Г. Бабаева., Л.Л. Головкина. - М.: Монолит, 2003. – 128с.
3. Головкина, Л.Л. Генетический полиморфизм тромбоцитспецифических антигенов: автореф. дис.... докт. мед. наук.- М., 2008.-42с.
4. Cavanagh, G. HPA genotyping with sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigation/ G. Cavanagh, A. Dunn, C.E Chapman., A. Metcalfe// Transfusion Medicine.- 1997.- v.7.-№ 1.-P.41-45.
5. Allen, D. Survey of the use and clinical effectiveness of HPA-1a/5b-negative platelet concentrates in proven or suspected platelet alloimmunization/ D.Allen, J. Samon, S. Benjamin, et.al.//Transfusion Medicine.- 2004.-№14.-P.409-417.
6. Ёлов, А.А. Генотипирование ДНК доноров и реципиентов крови как метод обеспечения антигенной безопасности трансфузий/ А.А. Ёлов, А.Г. Лихонин // Трансфузиология.- 2009.- т.10.- №1-2.-С.33.
7. Lucas, G. Recipient-derived HPA-1a antibodies: a cause of prolonged thrombocytopenia after unrelated donor stem cell transplantation/ G.Lucas, S. Culliford, F. Green, C. Sidra, A. Calvert, A. Green, P. Harrison, D. Harvey // Transfusion.- 2010.- 50.-P. 334-339.
8. Ghevaert, C. Developing recombinant HPA-1a-specific antibodies with abrogated Fcγ receptor binding for the treatment of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia/ C.Ghevaert, D.A. Wilcox, J. Fang, K.L. Armour, M.K. Clark, W.H. Ouwehand, L.M. Williamson // J Clin Invest.- 2008.-№118(8).-P.2929–2938

9. Prenatal management of alloimmune thrombocytopenia of the fetus. International forum// Vox Sanguinis.- 2003.-v.84.-P. 142-149.
10. Ficko, T. Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method/T. Ficko, V. Galvani, R. Ruprecht, T. Dovc, P. Rozman// Transfusion Medicine.- 2004.- v.14.- P.425–432.
11. Ruan, Li. Multicolor real-time polymerase chain reaction genotyping of six human platelet antigens using displacing probes/L.Ruan, P. Bin, L. Qingge// Transfusion.- 2007.- v.47.- P.1637-1642.
12. Ёлов, А.А. Типирование антигенов тромбоцитов методом ПЦР в реальном времени: Молекулярная диагностика – 2010/ А.А. Ёлов, В.В. Бурылёв., Н.В. Минеева, С.В. Гавровская, В.Н.Чеботкевич // Сб. тр. VII всерос. науч.-практич. конф. с международ. участием. –Т. 3.- С.60-61.
13. Johnson, M.P. Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR/ M.P. Johnson, L.M. Haupt, L.R. Griffiths // Nucleic Acids Research .-2004.- v. 32.- No.6.-P. 55.
14. Минеева, Н.В. Метод выявления антител к антигенам тромбоцитов/Н.В. Минеева, М.Н.Блинов, О.А. Заварзина, Е.В. Елхина, Н.Н. Бодрова, С.И. Капустин, Л.С. Приезжева, И.В. Поединенко //Трансфузиология.- 2007.- №1-2.- С.47-48.
15. Salem, A.H. Allele frequencies of the human platelet antigen-1 in the Egyptian population/ A.H. Salem, K. Han, M.A. Batzer // BMC Research Notes.- 2009.- 2:90 doi:10.1186/1756-0500-2-90
16. Красняков, В.К. Полиморфизм генов тромбоцитов у доноров крови Санкт-Петербурга/В.К. Красняков, И. Е. Павлова, Л. Н. Бубнова //Вестник Санкт-Петербургского университета. -2009.-Сер.11.-Вып.2.- С.115-119.
17. Pavic, M. Gene frequencies of platelet-specific antigens in Croatian population/ M. Pavic, R. Zadro, M. Radic, S Dodig // Transfusion Medicine.- 2010.-v. 20.-№ 2.- P.73-77.