

МОДИФИКАЦИЯ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА НЕПРЯМОЙ ПРОБЫ КУМБСА У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДАРАТУМУМАБОМ

A modification of the pre-analytical phase of the indirect Coombs test for multiple myeloma patients treated with daratumumab

Головкина Л. Л.¹, Минеева Н. В.², Менделеева Л. П.¹, Бессмел-
цев С. С.², Стремоухова А. Г.¹, Грибанова Е. О.¹, Соловьев М. В.¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр гематологии» Министерства здравоохранения России,
Москва, Россия

² ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии»
ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Golovkina L. L.¹, Mineeva N. V.², Mendeleeva L. P.¹, Bessmel-
zev S. S.², Stremoukhova A. G.¹, Gribanova E. O.¹, Solovyev M. V.¹

¹ National Research Center for Hematology, Moscow, Russian
Federation

² Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology,
St. Petersburg, Russian Federation

Резюме. Для лечения больных множественной мие-
ломой (ММ), рефрактерной к терапии ингибитора-
ми протеасом и иммуномодулирующими препара-
тами, применяют таргетные моноклональные антитела к
CD38, поскольку маркер CD38 обладает выраженной
экспрессией на злокачественных плазматических клет-
ках. Однако белок CD38 в незначительном количестве
представлен на эритроцитах. Взаимодействие терапев-
тических антител к CD38 с эритроцитами приводит к
появлению CD38-специфической агглютинации в неко-
торых иммуногематологических тестах.

Цель исследования: отработать и адаптировать мето-
дику устранения CD38-специфической агглютинации в
антиглобулиновом тесте путем обработки эритроцитов
дितिотреитолом.

Задачи исследования: изучить антигенный профиль
эритроцитов до и после обработки дितिотреитолом;
изучить иммуногематологические характеристики сы-
вороток и эритроцитов больных ММ, получающих ан-
титела к CD38.

Материалы и методы: исследовали сыворотки и эри-
троциты 9 больных ММ до и в процессе лечения анти-
телами к CD38, применяя стандартные эритроциты 3- и
11-клеточной панелей, эритроциты доноров компонен-
тов крови. Антигенный профиль эритроцитов до и после

Abstract. Daratumumab, the first therapeutic monoclonal
antibody that binds to CD38, is used for treatment of
patients with multiple myeloma. The CD38 transmembrane
protein is highly expressed on the surface of malignant
myeloma cells, but also, to a lesser extent, is expressed by
many other types of cells, including red blood cells (RBCs).
When daratumumab binds to CD38 expressed on RBCs,
this may result in positive indirect antiglobulin tests (IAT)
performed to identify immunological compatibility before
RBC transfusions. Anti-CD38-specific agglutination may
also variably affect autocontrol, direct antiglobulin test
(DAT), and eluate tests.

The aim of the study was to develop a protocol for
preventing CD38-specific agglutination in antiglobulin tests
by treatment of RBCs with dithiothreitol (DTT).

Materials and methods. Between July 2016 and
April 2017, 9 multiple myeloma patients undergoing
daratumumab treatment were tested using routine methods
in the Immunohematology Laboratory of the National
Hematological Research Center in Moscow. The tests included
ABO and Rh typing, extended phenotype matching, DAT,
and IAT in LISS/Coombs gel cards. Tests were performed
before and after treatment of RBCs with DTT.

Results. No daratumumab interference was observed in
ABO, Rh, Kell, MNS or Fy typing with IgM antibodies.

обработки их дитиотреитолом изучали методом гемагглютинации.

Результаты: метод обработки эритроцитов дитиотреитолом воспроизведен и адаптирован к условиям работы специалистов клинической лабораторной диагностики Российской Федерации. Отработаны нюансы применения дитиотреитола. Показана эффективность дитиотреитола при устранении CD38-специфической агглютинации в иммунологических тестах у больных ММ, получавших антитела к CD38. Показано, что у всех больных аутоконтроль, прямая проба Кумбса были отрицательными до и после введения антител к CD38. Результаты пробы на совместимость между сывороткой больного и донорскими эритроцитами, выполняемые в непрямом антиглобулиновом тесте, результаты скрининга аллоиммунных антиэритроцитарных антител у больных на фоне проводимого лечения антителами к CD38 можно было оценивать только после обработки планируемых к переливанию эритроцитов и тест-эритроцитов дитиотреитолом. Без обработки дитиотреитолом CD38-специфическую агглютинацию в гелевых картах LISS/Coombs оценивали на 1+ — 2+. Лечение антителами к CD38 не мешало проведению расширенного фенотипирования эритроцитов с использованием реактивов на основе полных специфических антител (систем ABO, Резус, Келл, MNS, Даффи).

Заключение: дитиотреитол позволяет устранять CD38-специфическую агглютинацию у больных ММ, получающих терапию антителами к CD38.

Ключевые слова: иммуногематологические исследования; антиглобулиновый тест непрямой и прямой; пробы на совместимость; аллоиммунные антитела; эритроцит; CD38; антитела к CD38; множественная миелома; таргетная терапия; дитиотреитол; антигены эритроцитарных систем

Для цитирования: Головкина Л. Л., Минеева Н. В., Менделеева Л. П., Бессмельцев С. С., Стремоухова А. Г., Грибанова Е. О., Соловьев М. В. *Модификация преаналитического этапа непрямой пробы Кумбса у больных множественной миеломой при лечении даратумумабом.* Гематология и трансфузиология 2018; 63(1):44–54 doi: <http://dx.doi.org/10.25837/HAT.2018.45..1..004>

Для корреспонденции: Головкина Лариса Леонидовна, д. м. н., заведующая лабораторией трансфузиологической иммуногематологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения России, Москва, Россия
Электронная почта: largol@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 14.05.18

Принята к печати 16.05.18

DAT and auto control were also negative in all patients. On the other hand, all patients showed daratumumab-mediated positive IAT, which was resolved by treatment of RBCs with DTT.

Conclusions. Anti-CD38 antibodies interfere with serological tests. This interference can be resolved by treating RBCs with DTT. Blood banks and immunohematological laboratories should be informed that a patient is receiving treatment with anti-CD38.

Keywords: immunohematological tests; direct antiglobulin test; indirect antiglobulin test; blood compatibility tests; red blood cells; alloimmune antibodies; CD38; anti-CD38 antibodies; multiple myeloma; target therapy; dithiothreitol; red blood cell antigens

For citation: Golovkina L. L., Mineeva N. V., Mendeleeva L. P., Bessmelzev S. S., Stremoukhova A. G., Griбанова E. O., Solovyev M. V.

A modification of the pre-analytical phase of the indirect Coombs test for multiple myeloma patients treated with daratumumab.

Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfusiology) 2018; 63(1):44–54 (in Russian)

doi: <http://dx.doi.org/10.25837/HAT.2018.45..1..004>

For correspondence: Golovkina Larisa L., MD, PhD, DSc, head of laboratory of transfusiological immunohematology, National Research Center for Hematology, Moscow, 125165, Russian Federation
E-mail: largol@mail.ru

Information about authors:

Golovkina L. L., ResearcherID: M-6316-2014; Scopus Author ID:

6602579655; SPIN-код: 1934-4336; AuthorID: 605358;

Mineeva N. V., SPIN-код: 7528-9460; AuthorID: 691696; <https://orcid.org/0000-0001-7137-8877>;

Mendeleeva L. P., Scopus Author ID: 6701562648; ResearcherID:

H-7845-2016; SPIN-код: 2564-2246; AuthorID: 122877;

Bessmelzev S. S., SPIN-код: 4955-1364; AuthorID: 274497;

Stremoukhova A. G., AuthorID: 715042;

Griбанова E. O., SPIN-код: 3772-7386; AuthorID: 303138;

Solovyev M. V., SPIN-код: 8939-0286; AuthorID: 963886.

Financial disclosure. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 14 May 2018

Accepted 16 May 2018

Введение

В течение последних полутора десятилетий схемы терапии множественной миеломы (ММ) включали два основных класса препаратов — ингибиторы протеасом (ИП) и иммуномодулирующие препараты (ИМП), что позволило значительно улучшить результаты лечения, повысить показатели общей и беспрогрессивной выживаемости. В то же время формирующаяся «двойная рефрактерность» [1, 2] к этим лекарственным препаратам диктует необходимость поиска принципиально новых подходов к терапии ММ.

Моноклональные антитела (МА) являются таргетными препаратами, реагирующими непосредственно с опухолевыми клетками. Злокачественные плазматические клетки экспрессируют на своей поверхности молекулы CD38 [3]. В клинической практике применяют МА к CD38, которые, являясь иммуноглобулинами класса G (неполные IgG1κ-антитела), оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки посредством комплементзависимой и антителозависимой цитотоксичности, а также запуска клеточного апоптоза [4]. МА к CD38 продемонстрировали высокую эффективность в клинических исследованиях I и II фазы в качестве монотерапии у больных ММ после обширной предшествующей терапии, в стадии рецидива или при рефрактерности к применяемым для лечения препаратам, а именно — ИП и ИМП [4].

Однако CD38 экспрессируются не только на поверхности злокачественных плазматических клеток, но и на мембране эритроцитов. При этом взаимодействие терапевтических неполных антител к CD38 с эритроцитами не приводит к острому гемолизу из-за низкой экспрессии белка CD38 на них [4]. Терапия МА к CD38 обычно сопровождается незначительным снижением уровня гемоглобина у пациентов (менее чем на 5–10 г/л) [5, 6].

Часто больные ММ нуждаются в переливании эритроцитной массы вследствие анемии. Перед трансфузиями донорской крови и/или ее компонентов необходимо выполнить иммунологические исследования, часть из которых заключается в непрямом антиглобулиновом тесте (НАТ), называемом также непрямой пробой Кумбса (Приказ Минздрава РФ №183н от 02.04.13 «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и/или ее компонентов») [7].

Непрямую пробу Кумбса используют для исследования на индивидуальную совместимость донора и реципиента по неполным IgG-антителам, а также для идентификации и установления специфичности неполных антиэритроцитарных антител в сыворотке реципиента (больного) — с панелями тест-эритроцитов: для скрининга антител применяют трехклеточную панель, для выявления специфичности антител используют панель эритроцитов, состоящую из 10–11 образцов клеток. Кроме того, непрямую пробу

Кумбса применяют для выявления некоторых эритроцитарных антигенов с использованием реактивов, содержащих специфические IgG-антитела.

Неполные антитела к CD38, применяемые для лечения больных ММ и циркулирующие в плазме, связываются как с эритроцитами самого больного и эритроцитами доноров, планируемых для переливания, так и с тест-эритроцитами, которые используются для исследования антиэритроцитарных антител, вызывая феномен «панагглютинации» (CD38-специфическая агглютинация) в иммунологических реакциях в НАТ и с конглютинами. Фиксированные на тест-эритроцитах антитела к CD38 будут препятствовать идентификации аллоиммунных антител в сыворотке больного; антитела к CD38, фиксированные на донорских эритроцитах, будут создавать эффект их несовместимости с сывороткой больного, а фиксированные на эритроцитах больного неполные антитела к CD38 будут препятствовать выявлению антигенов эритроцитов при работе со специфическими неполными антителами. Количество белка CD38 на эритроцитах незначительно [4]. Поэтому CD38-специфическая агглютинация при наличии большого количества антител к CD38 (концентрация 1–10 мкл/мл) обычно выражена слабо (в гелевых картах на 1+), но по мере снижения концентрации антител (до 0,1–0,5 мкл/мл) сила агглютинации снижается до визуализации ее только под микроскопом [5]. Таким образом, CD38-специфическая агглютинация является дозозависимой.

Антитела к CD38 не влияют на результаты иммунологических реакций при использовании реактивов на основе полных IgM специфических антител. Такими реактивами проводят определение антигенов эритроцитов систем АВО, Резус [5, 8] и других. Поэтому сложностей в определении групповой и резус-принадлежности больного после введения ему антител к CD38 возникать не должно.

Длительность циркуляции антител к CD38 в организме больного после прекращения лечения колеблется от 2 до 6 мес [5, 9], т. е. все это время в иммунологических реакциях с применением конглютининов, в прямой и непрямой реакциях Кумбса (в классической постановке в пробирках или в гелевых картах с антиглобулиновой сывороткой) может наблюдаться положительная CD38-специфическая агглютинация. Поэтому специалисты службы крови и иммуногематологических лабораторий должны быть информированы о лечении больного антителами к CD38.

Способы устранения CD38-специфической агглютинации

Главная задача иммуногематологов — обеспечение иммунологической безопасности трансфузий эритроцитсодержащих сред (ЭСС). Для этого необходимо правильно выбрать донорские ЭСС, совместимые с

сывороткой больного. Необходимо обеспечить выявление антигенного профиля больного, идентификацию аллоиммунных антител у него и грамотно оценить результаты проб на совместимость перед переливанием аллогенных эритроцитов. Для выполнения поставленных задач важен поиск методик по устранению влияния антител к CD38 на результаты непрямого антиглобулинового теста.

Существует два подхода к устранению влияния антител к CD38 на иммунологические реакции — это либо нейтрализация самих антител в плазме/сыворотке больного *in vitro*, либо денатурация белка CD38 непосредственно на эритроцитах. Для обеспечения иммунологической безопасности трансфузий ЭСС необходимо подбирать компоненты с учетом антигенного профиля реципиента и донора, т. е. можно проводить расширенное фенотипирование эритроцитов больного до введения антител к CD38 и/или генотипирование, которое возможно на любом этапе лечения [10].

Нейтрализация антител к CD38 в плазме/сыворотке больного *in vitro* перед проведением серологических реакций

Нейтрализация антител к CD38 в сыворотке больного достигается добавлением растворимых антигенов CD38 или антиидиотипических антител. Однако такие реактивы находятся в стадии разработки и в настоящее время недоступны для широкого применения [10].

Денатурация белка CD38 на эритроцитах

Белок CD38 имеет шесть дисульфидных связей, определяющих пространственную конфигурацию самого белка и являющихся критическими для его структуры. Некоторые химические вещества, такие как дитиотреитол [11], 2-меркаптоэтанол [12] и трипсин [8], способны разрушать эти важные дисульфидные мостики. Под воздействием указанных реагентов происходит денатурация внеклеточного домена молекулы CD38, который утрачивает способность связывать терапевтические антитела к CD38. Дитиотреитол (ДТТ) снижает связывание антител к CD38 с эритроцитами на 92%, в то время как трипсин только на 40% [8].

Денатурация белка CD38 на эритроцитах дитиотреитолом

ДТТ является дешевым и доступным химическим веществом, которое лучше всего подходит для обработки эритроцитов как самого больного ММ, так и тест-эритроцитов клеточных панелей, а также донорских эритроцитов, планируемых для переливания. Антигены некоторых эритроцитарных систем разрушаются под воздействием ДТТ, что может исказить результаты скрининга антител у больного, проб на совместимость по неполным антителам из-

за появления ложноотрицательных результатов. Под действием ДТТ разрушаются антигены, имеющие в своей структуре дисульфидные связи: систем Kell (символ ISBT KEL), Dombrock (символ ISBT DO), Indian (символ ISBT IN), John Milton Hagen (символ ISBT JMH), Knops (символ ISBT KN), Landsteiner-Wiener (символ ISBT LW), Lutheran (символ ISBT LU), Raph (символ ISBT RAPH), Cartwright (символ ISBT YT) [10]. Антитела к антигенам перечисленных систем могут вызывать посттрансфузионные реакции разной степени тяжести. Для жителей Российской Федерации наиболее значимым является антиген Келл системы Kell, который имеет высокую иммуногенную активность [7].

Цель исследования: отработать и адаптировать методику устранения CD38-специфической агглютинации в антиглобулиновом тесте путем обработки эритроцитов ДТТ.

Задачами исследования были: изучить антигенный профиль эритроцитов до и после обработки ДТТ; изучить иммуногематологические характеристики сывороток и эритроцитов больных ММ, получающих терапию антителами к CD38.

Материалы и методы

В иммуногематологическую лабораторию ФГБУ «НМИЦ гематологии» в период с июля 2016 г. по апрель 2017 г. была направлена кровь 9 больных ММ (7 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 51 до 74 лет (медиана 62 года), подписавших информированное согласие на участие в клиническом исследовании. На предыдущих этапах лечения 6 больных получали многочисленные курсы, включавшие три таргетных препарата (бортезомиб, талидомид, леналидомид), 1 больной — 4 препарата (бортезомиб, карфилзомиб, леналидомид, помалидомид). Кроме того, 4 больным была выполнена трансплантация аутологичных стволовых клеток. У всех больных была подтверждена двойная рефрактерность опухоли к применявшимся ингибиторам протеасом и иммуномодулирующим препаратам, в связи с чем им была начата монотерапия препаратом даратумумаб — МА к CD38 (в дозе 16 мг/кг на каждое введение).

Материалом для исследования служили сыворотки и эритроциты больных ММ до и в процессе лечения антителами к CD38 (на фоне 1–6 курсов терапии, то есть после 1–15 введений даратумумаба), стандартные эритроциты 3- и 11-клеточной панелей фирмы «BioRad», эритроциты доноров компонентов крови.

Приготовление рабочего раствора дитиотреитола

Для приготовления базового 1 М раствора ДТТ 154 мг ДТТ разводили в 10 мл фосфатного буфера с pH 8,0. Для полного растворения емкость с раствором ДТТ на 10 мин помещали в термостат или водяную баню с температурой 37 °С. Получившийся раствор разливали в

пластиковые пробирки по 1 мл и хранили при -18°C или менее. Замораживать можно только базовый 1 М раствор ДТТ.

Для обработки эритроцитов необходим 0,2 М раствор ДТТ. Его либо получали из базового 1 М раствора, либо готовили свежий 0,2 М раствор.

Для приготовления 0,2 М раствора ДТТ базовый 1 М раствор ДТТ размораживали при комнатной температуре, хорошо перемешивали путем встряхивания и разводили в 5 раз фосфатным буфером с pH 8,0 (к 1 мл ДТТ добавляли 4 мл фосфатного буфера).

Для приготовления свежего 0,2 М раствора ДТТ к 1 г ДТТ добавляли 32 мл фосфатного буфера с pH 8,0. Для полного растворения емкость с раствором ДТТ на 10 мин помещали в термостат или водяную баню с температурой 37°C . Неиспользованный 0,2 М раствор ДТТ нельзя замораживать для повторного использования, поэтому 0,2 М раствор ДТТ должен быть только свежеприготовленным!

Тестовые контроли

До проведения основного исследования выбирали и готовили взвеси эритроцитов для контроля эффективности действия ДТТ, т. е. эритроциты с антигенами, подверженными (антигены системы Келл) и не подверженными (антигены системы Резус и т. д.) действию ДТТ:

- для отрицательного контроля использовали эритроциты E+ (фенотип E+ E+ или E+ e+) или любого фенотипа системы Резус;
- для положительного контроля использовали эритроциты, содержащие антигены Келл и/или Челлано (фенотип K+k+, K+K+, K-k+).

Обработка эритроцитов дитиотреитолом

Подготавливали 3—5% суспензию контрольных эритроцитов; для приготовления 5% взвеси эритроцитов к 0,5 мл 0,9% физиологического раствора (заводского производства) добавляли 25 мкл осадка эритроцитов или 50 мкл цельной крови либо брали уже готовую 3—5% взвесь тест-эритроцитов скрининговой панели I, II, III или 10—11-клеточной панели для идентификации специфичностей аллоантител; таким же образом подготавливали 3—5% суспензию исследуемых эритроцитов больного или донорских эритроцитов; подписывали пробирки.

По 200 мкл подготовленных суспензий клеток переносили в соответствующим образом промаркированные пробирки и однократно отмывали 0,9% раствором натрия хлорида (заводского производства) или фосфатным буфером с pH 7,4. По 100 мкл 3—5% суспензии отмытых клеток осаждали центрифугированием, к осадку эритроцитов добавляли 400 мкл 0,2 М ДТТ, после чего перемешивали путем встряхивания и на 30—45 мин помещали в водяную баню при 37°C (встряхивая каждые 10 мин). После инкубации эри-

троциты 4 раза отмывали 0,9% раствором натрия хлорида (заводского производства) или фосфатным буфером с pH 7,4.

При контроле эффективности обработки эритроцитов клетки с ДТТ должны сохранить антигены системы Резус, но утратить антигены Келл и Челлано. Если результаты определения антигенов не соответствовали ожидаемым, процедуру обработки эритроцитов ДТТ повторяли. Если процесс обработки эритроцитов ДТТ оценивали как эффективный, то эритроциты использовали для проведения прямой и непрямой пробы Кумбса. Проведение прямого и непрямой антиглобулинового теста (пробы Кумбса) осуществляли в пробирках или гелевых картах LISS/Coombs.

Прямой антиглобулиновый тест в пробирках

Прямой антиглобулиновый тест (АГТ) проводили в один этап по методике производителя антиглобулиновой сыворотки (ООО «Гематолог», Россия). Он предназначен для выявления антиэритроцитарных антител, фиксированных на эритроцитах *in vivo*. Результаты прямой пробы Кумбса, выполненной в пробирках с антиглобулиновой сывороткой, оценивали визуально и микроскопически.

Непрямой антиглобулиновый тест в пробирках

Непрямой антиглобулиновый тест проводили в два этапа по методике производителя антиглобулиновой сыворотки (ООО «Гематолог», Россия). На первом этапе происходит фиксация антител на эритроцитах *in vitro*, на втором осуществляется их выявление в реакции агглютинации с помощью антиглобулиновой сыворотки. Применение раствора LISS позволяет сократить продолжительность первого этапа.

Прямую и непрямую пробу Кумбса в гелевых картах выполняли по методикам производителей карт. Агглютинацию в гелевых колонках оценивали в баллах от 0 (отсутствие агглютинации) до 4+ (присутствие агглютинации).

Определение фенотипа эритроцитов систем АВО, Резус, Келл, MNS, Кидд (Jk), Даффи (Fu) у больных ММ выполняли соответствующими специфическими МА по методикам производителя (ООО «Гематолог», Россия).

Результаты и обсуждение

Результаты лабораторных испытаний воздействия ДТТ на антигены эритроцитов

При отработке и адаптации метода обработки эритроцитов ДТТ все исследования повторяли 10 раз с разными образцами клеток. В начале работы проверяли устойчивость растворов ДТТ разной молярности к воздействию температуры -18°C . Для этого 1 М и 0,2 М растворы замораживали и хранили от 24 до 120 ч. Исследования показали, что свежеприготовлен-

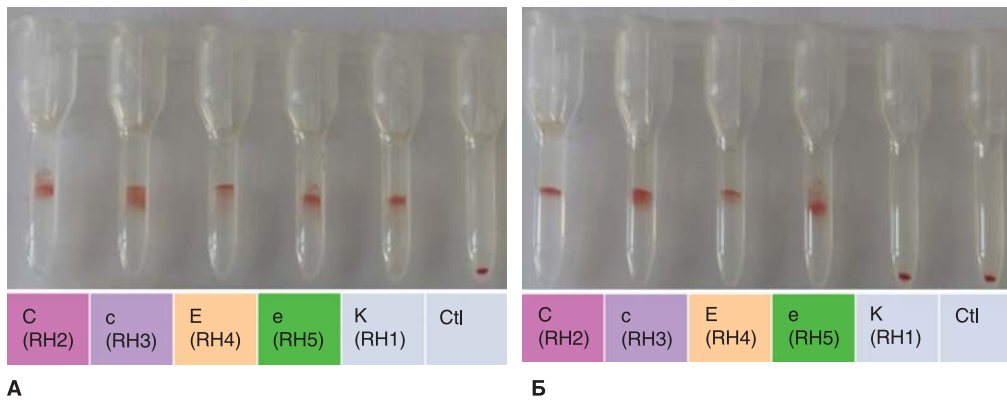


Рисунок 1. Результаты реакции гемагглютинации в гелевых картах, предназначенных для определения фенотипа системы Резус и антигена К. **А.** Эритроциты не обработаны ДТТ (контроль). **Б.** После обработки эритроцитов ДТТ антигены системы Резус сохраняют свою способность реагировать со специфическими антителами (агглютинированные эритроциты расположены наверху геля), в то время как эритроциты с антигеном К теряют эту способность (неагглютинированные эритроциты расположены на дне пробирки с гелем). Сtl — отрицательный контроль.

ный 0,2 М раствор и 0,2 М раствор ДТТ, приготовленный из размороженного 1 М раствора, сохраняли свою активность, в то время как активность 0,2 М раствора ДТТ снижалась после всех периодов заморозки.

После обработки эритроцитов ДТТ проводили их отмывку. Сравнение результатов агглютинации эритроцитов с анти-Е и анти-Келл антителами после отмывки их фосфатно-буферным или 0,9% раствором натрия хлорида не выявило различия, что указывало на возможность использования 0,9% раствора хлорида натрия.

По методике зарубежных авторов [13] предложено использовать в качестве контроля эффективности обработки эритроцитов ДТТ Е+ и К+ эритроциты. Однако эти антигены нечасто встречаются у жителей Российской Федерации: антиген Е у 30% и антиген К у 10%. Поэтому мы предлагаем применять в качестве контроля любые антигены системы Резус и

системы Келл. Исследования доказали возможность применения такого подхода. На рис. 1 и 2 приведены результаты фенотипирования эритроцитов по антигенам СсЕе Кк в гелевых картах до и после их обработки ДТТ.

Результаты лабораторных исследований сывороток и эритроцитов больных множественной миеломой, получавших терапию моноклональными антителами к CD38

Серологическими методами у 9 больных до и после введения даратумумаба была определена групповая принадлежность по антигенам систем АВО, Резус, Келл с использованием МА класса IgM соответствующей специфичности, а также было выполнено расширенное фенотипирование по антигенам систем MNS, Даффи и Кидд. Антигены систем MNS и Даффи определяли посредством МА IgM класса, антигены системы Кидд — посредством МА IgG-класса. Затруднений в определении групповой принадлежности антигенов систем АВО, Резус, Келл, MNS и Даффи у больных ни до, ни после введения даратумумаба не было. Антигены системы Кидд были идентифицированы у больных дважды — до введения даратумумаба с нативными эритроцитами больного и после введения препарата с эритроцитами, обработанными ДТТ (табл. 1).

Скрининг антиэритроцитарных антител выполняли больным до введения даратумумаба в непрямой пробе Кумбса в гелевых картах LISS/Coombs с использованием трехклеточной скрининговой панели тест-эритроцитов (фенотипы ccdee, CCDee, ccDEE). Образцы сывороток больных после введения даратумумаба тестировали с тест-эритроцитами 3- и 11-клеточной панелей, обработанными и не обработанными ДТТ. Результаты скрининга антиэритроцитарных антител у всех больных до введения даратумумаба были отрицательными, т. е. в их сыворотках отсутствовали аллоиммунные антитела. Трансфузии эритроцитов не

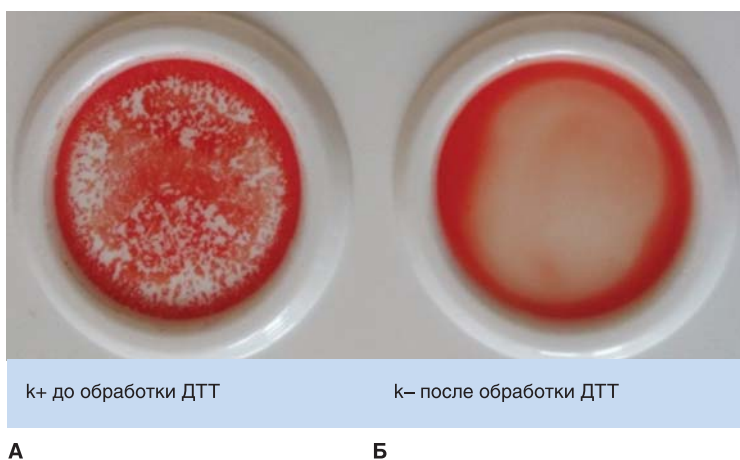


Рисунок 2. Результаты реакции гемагглютинации с анти-к антителами до (**А**) и после (**Б**) обработки эритроцитов ДТТ. Эритроциты с антигеном к после обработки ДТТ не агглютинируются специфическими антителами (**Б**).

Таблица 1. Результаты расширенного фенотипирования больных множественной миеломой до и после введения даратумумаба

Больные	Системы антигенов															
	ABO	Резус					Келл		MNS				Кидд		Даффи	
		C	c	D	E	e	K	k	M	N	S	s	Jka	Jkb	Fya	Fyb
Больной Д.	B	+	+	+	–	+	–	+	–	+	+	+	+	–	–	+
Больная Б.	A	Cw	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	–
Больной К.	B	+	+	+	–	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+
Больной Г.	B	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Больной С.	O	Cw	+	+	–	+	–	+	+	–	–	+	+	–	+	+
Больной М.	AB	+	–	+	–	+	–	+	+	–	+	+	+	–	–	+
Больной З.	O	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Больной К. Я.	O	–	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Больной Т.	AB	–	+	–	–	+	–	+	+	+	+	–	+	–	–	+

Таблица 2. Результаты иммуногематологических исследований больных множественной миеломой

Больные	Возраст, лет	Пол	Результаты исследований сывороток и эритроцитов больных до введения даратумумаба		Количество введений даратумумаба	Результаты исследований после введения даратумумаба			
			Скрининг антител в непрямом АГТ	Прямой АГТ		Скрининг антител в непрямом АГТ		Прямой АГТ	Аутоконтроль
						до обра-ботки ДТТ	после обра-ботки ДТТ		
Больной З.	54	М	Отр.	Отр.	10	2+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной К.	74	М	Отр.	Отр.	2	1+	Отр.	Отр.	Отр.
Больная Б.	64	Ж	Отр.	Отр.	13	2+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной К. Я.	65	М	Отр.	Отр.	4	1+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной Д.	70	М	Отр.	Отр.	5	2+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной М.	57	М	Отр.	Отр.	14	2+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной Г.	62	М	Отр.	Отр.	15	1+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной Т.	51	М	Отр.	Отр.	12	1+	Отр.	Отр.	Отр.
Больной З.	54	М	Отр.	Отр.	8	1+	Отр.	Отр.	Отр.

АГТ — антиглобулиновый тест.

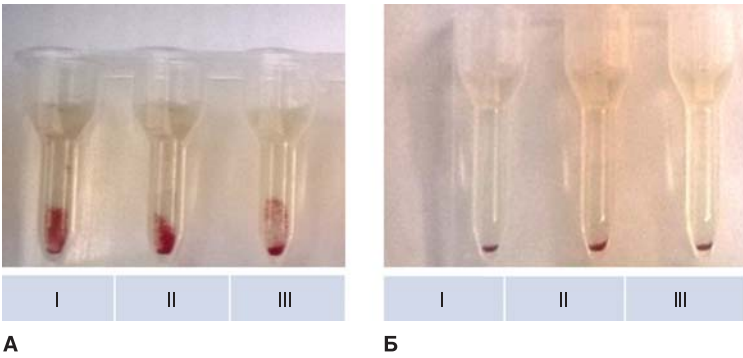


Рисунок 3. Больная 3. Диагноз множественная миелома. **А.** Результаты не прямой пробы Кумбса; положительный результат (2+) после введения даратумумаба. **Б.** Отрицательный результат после введения даратумумаба и обработки эритроцитов трехклеточной панели ДТТ.

проводили. После введения даратумумаба скрининг антител повторили для моделирования ситуации поиска антител: у 5 пациентов наблюдали положительный результат на 1+, у 4 — на 2+ (табл. 2 и рис. 3, А). После обработки тест-эритроцитов ДТТ наблюдали отрицательный результат непрямого антиглобулинового теста (рис. 3, Б). Полученные данные суммированы в табл. 2.

Чтобы смоделировать ситуацию идентификации аллоиммунных антител, провели исследования сывороток всех больных после введения даратумумаба с тест-эритроцитами идентификационной 11-клеточной панели. Результат непрямого антиглобулинового теста был положительным на 2+ с не обработанными ДТТ эритроцитами (рис. 4, А) и отрицательным с эритро-

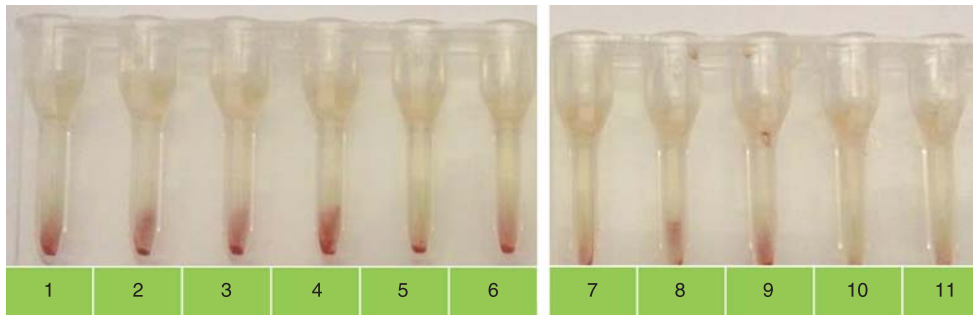
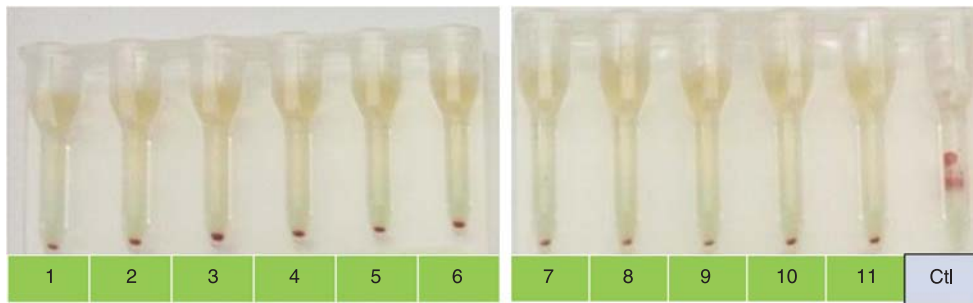
**А****Б**

Рисунок 4. Результаты непрямого антиглобулинового теста с не обработанными (**А**) и обработанными (**Б**) ДТТ тест-эритроцитами 1 l-клеточной панели и сывороткой больного, получавшего антитела к CD38. **А.** Положительный результат. **Б.** Отрицательный результат. Ctl — положительный контроль: цоликлон анти-D с неполными антителами и D⁺ эритроциты.

цитами, обработанными ДТТ (рис. 4, Б). ДТТ разрушает антигены системы Келл, поэтому присутствие у больного, получающего даратумумаб, аллоиммунных анти-К антител можно не выявить. Для предупреждения посттрансфузионных осложнений важно применять совместимые по антигенам системы Келл ЭСС [7].

Прямую пробу Кумбса проводили в пробирках и гелевых колонках LISS/Coombs с полиспецифической антиглобулиновой сывороткой. У всех 9 больных ММ до и после введения антител к CD38 прямая проба Кумбса была отрицательной (см. табл. 2), что указывало на отсутствие фиксированных аутоантител на эритроцитах до введения даратумумаба и фиксированных антител к CD38 после введения препарата. Аутоконтроль у данной категории пациентов также был отрицательным (рис. 5). Отрицательные результаты прямой и непрямой пробы Кумбса, выполненной между аутосыворотками и аутоэритроцитами больных после введения антител к CD38, объясняли следующим образом: на разных эритроцитах одного и того же человека присутствует разное количество белка CD38. После введения антител к CD38 эритроциты с высокой экспрессией этого белка разрушаются в селезенке [5]. В кровеносном русле больного остаются эритроциты с низкой экспрессией CD38 или вообще без нее. Малое количество антигенных детерминант адсорбирует мало антител к CD38, количество которых недостаточно для выявления в непрямом антиглобулиновом тесте [5]. Sullivan et al. доказали [14], что даратумумаб индуцирует исчезновение белка CD38

с мембраны эритроцитов больного в течение 7 дней после первого введения. После прекращения лечения экспрессия CD38 восстанавливается.

Больным ММ, получавшим антитела к CD38, для купирования проявлений анемического синдрома могут потребоваться трансфузии ЭСС. Перед каждой трансфузией врач, выполняющий ее, обязан провести пробы на совместимость по полным и неполным антителам между сывороткой больного и донорскими

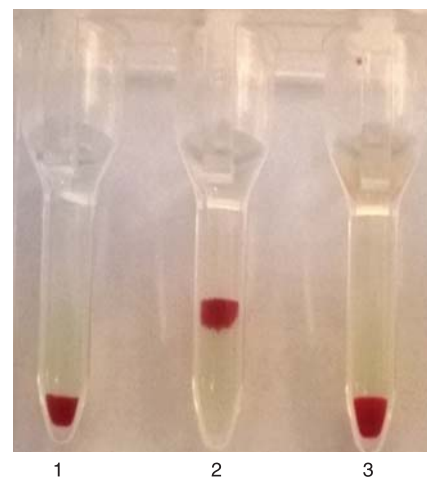


Рисунок 5. Больная Б. Диагноз множественная миелома. Отрицательные результаты прямой пробы Кумбса (пробирка 1) и аутоконтроля (пробирка 3) в гелевых картах LISS/Coombs. В пробирке 2 показан результат положительного контроля (эритроциты D⁺ и анти-D неполные антитела).

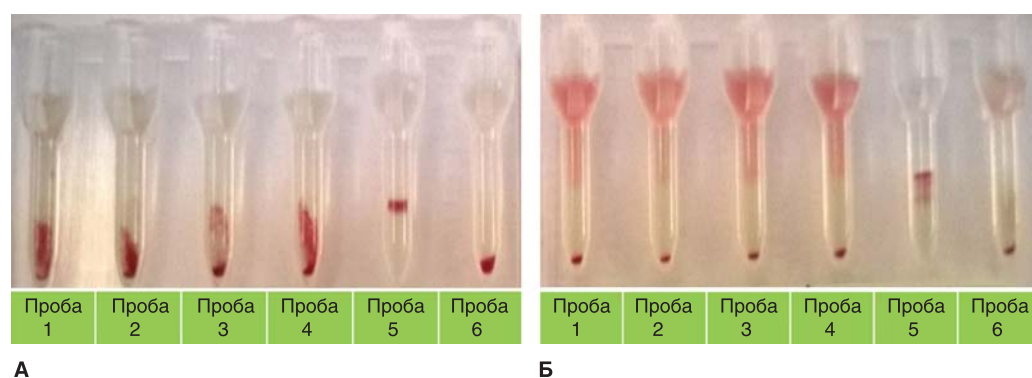


Рисунок 6. Больная С. Диагноз множественная миелома. Результаты непрямого антиглобулинового теста с двумя образцами не обработанных (**А**) и обработанных (**Б**) ДТТ аллогенных эритроцитов и двумя образцами сыворотки после введения даратумумаба. Проба № 5 на рисунках **А** и **Б** — положительный контроль (эритроциты D+ и анти-D неполные антитела). Проба № 6 — отрицательный контроль (эритроциты D- и анти-D неполные антитела).

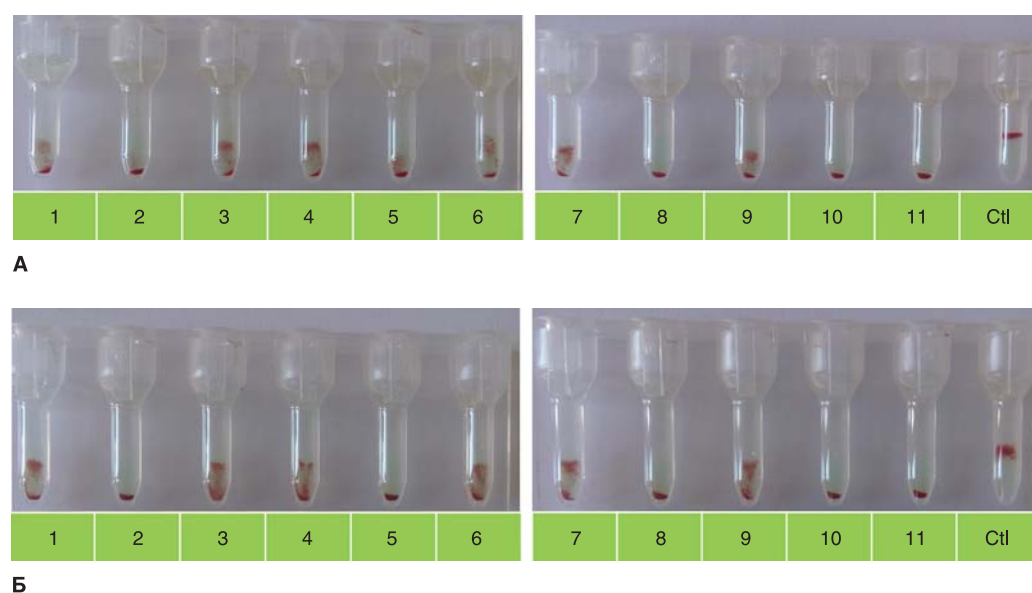


Рисунок 7. Больная Д. Диагноз множественная миелома. Результаты идентификации специфичности аллоиммунных антител в сыворотке, содержащей антитела к CD38 с не обработанными (**А**) и обработанными (**Б**) ДТТ тест-эритроцитами 11-клеточной панели. **А.** Результаты непрямого антиглобулинового теста с не обработанными ДТТ тест-эритроцитами интерпретации не подлежат (положительный результат в колонках 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9; ctl — положительный контроль: цоликлон анти-D с неполными антителами и D+ эритроциты). **Б.** После обработки тест-эритроцитов ДТТ в сыворотке четко определено присутствие анти-Fya антител (положительный результат в колонках 1, 3, 4, 6, 7, 9; ctl — положительный контроль: цоликлон анти-D с неполными антителами и D+ эритроциты).

эритроцитами, планируемыми для переливания. Даратумумаб не затрудняет интерпретацию результатов реакции прямой агглютинации (холодовой пробы на совместимость по IgM-антителам), но будет связываться с CD38-рецепторами донорских эритроцитов в непрямом антиглобулиновом тесте. CD38-специфическая агглютинация может маскировать истинную несовместимость по IgG-антителам. Подбор донорских эритроцитов перед трансфузиями осуществляли посредством реакции солевой агглютинации и не прямой пробы Кумбса в гелевых колонках.

Мы провели пробу на совместимость в непрямом антиглобулиновом тесте между двумя образцами эритроцитов доноров и сывороткой больной С. после

введения даратумумаба. Результат непрямого антиглобулинового теста был положительным на 2+ с не обработанными ДТТ эритроцитами (рис. 6, А) и отрицательным с обработанными ДТТ эритроцитами (рис. 6, Б), т. е. планируемые для переливания эритроциты были совместимы с сывороткой реципиента. Однако следует учитывать, что ДТТ разрушает эритроцитарные антигены, имеющие в своей структуре дисульфидные связи, в частности антигены системы Келл, поэтому пробы на совместимость по неполным антителам, выполняемые в непрямом антиглобулиновом тесте, могут быть ложноотрицательными. Для предупреждения посттрансфузионных осложнений вследствие несовместимости по редким антителам пациентам можно

проводить расширенное фенотипирование по клинически значимым антигенам эритроцитов до введения антител к CD38 и переливать эритроциты доноров с учетом антигенной структуры реципиента.

У больных ММ, которым вводили даратумумаб, в сыворотке могут присутствовать эритроцитарные аллоиммунные антитела, выработавшиеся в результате предшествующих беременностей или трансфузий ЭСС. При скрининге аллоантител в сыворотке больных ММ неполные антитела к CD38, взаимодействуя с тест-эритроцитами в непрямом антиглобулиновом тесте, вызывают их агглютинацию, которая может маскировать положительные реакции, обусловленные аллоантителами [15–17]. Поэтому скрининг антител у больных после введения даратумумаба следует проводить с тест-эритроцитами после их обработки ДТТ. На рис. 7 представлены результаты идентификации аллоиммунных антител в сыворотке больного Д., содержащей антитела к CD38, с не обработанными (А) и обработанными (Б) ДТТ тест-эритроцитами 11-клеточной панели. Результаты непрямого антиглобулинового теста с не обработанными ДТТ тест-эритроцитами (А) интерпретации не подлежат. После обработки тест-эритроцитов (Б) ДТТ в сыворотке четко определено присутствие анти- F_{α} антител. CD38-специфическую агглютинацию наблюдали не со всеми тест-эритроцитами (рис. 7, А), что можно объяснить разной экспрессией белка CD38 на эритроцитах 11-клеточной панели: при малом количестве антигена CD38 на эритроцитах CD38-специфическая агглютинация формироваться не будет.

Заключение

- Антитела к CD38 влияют на результаты тестов, выполняемых перед трансфузией в непрямой пробе Кумбса (проба на совместимость по антителам класса IgG, скрининг антиэритроцитарных антител, а также определение антигенов эритроцитов с помощью неполных специфических антител).
- В настоящее время разработаны методы обработки эритроцитов ДТТ, которые специалисты иммуногематологических лабораторий и отделений переливания крови могут использовать для устранения влияния антител к CD38 на результаты тестов, проводимых перед трансфузией.
- Антитела к CD38 не взаимодействуют с эритроцитами, обработанными ДТТ.
- ДТТ денатурирует антигены, имеющие в своей структуре дисульфидные связи, что обязательно надо учитывать при постановке проб на индивидуальную совместимость перед трансфузиями ЭСС, при скрининге и идентификации специфичностей аллоиммунных антиэритроцитарных антител, выполняемых в непрямом антиглобулиновом тесте.
- Для предупреждения посттрансфузионных осложнений вследствие несовместимости по редким антигенам пациентам можно проводить расширенное фе-

нотипирование по клинически значимым антигенам эритроцитов до введения антител к CD38 и переливать эритроциты доноров с учетом антигенной структуры реципиента.

- Специалисты иммуногематологических лабораторий и отделений переливания крови должны быть предупреждены о лечении больного ММ антителами к CD38.

Рекомендации по обследованию больных множественной миеломой для иммуногематологов и лечащих врачей

Обязательно следует оповещать специалистов службы крови и иммуногематологических лабораторий о лечении больного антителами к CD38.

Перед назначением препаратов антител к CD38 необходимо выполнить определение группы крови и скрининг антиэритроцитарных антител у больного. Желательно провести расширенное фенотипирование эритроцитов больных по клинически значимым антигенам.

После или в процессе лечения антителами к CD38:

- Антигены систем АВО, Резус и Келл можно выявить специфическими антителами класса IgM на протяжении всего курса терапии антителами к CD38.
- Для скрининга или идентификации специфичности антител, для постановки проб на совместимость по неполным антителам в непрямой пробе Кумбса необходимо использовать эритроциты, обработанные дитиотреитолом.
- Поскольку дитиотреитол разрушает антигены системы Келл, то после проведения пробы на совместимость в непрямой пробе Кумбса больному необходимо переливать К– (отрицательные) эритроциты, за исключением больных с фенотипом КК.

Литература

1. Kumar S, Lee J, Lahuerta J et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: A multicenter international myeloma working group study. *Leukemia* 2012; 26: 149–157.
2. Usmani S, Ahmadi T, Ng Y et al. Analysis of real-world data on overall survival in multiple myeloma patients with ≥ 3 prior lines of therapy including a proteasome inhibitor (PI) and an immunomodulatory drug (IMiD), or double refractory to a PI and an IMiD. *Oncologist* 2016; 21: 1–7.
3. Sherbenou D, Behrens C, Su Y et al. The development of potential antibody-based therapies for myeloma. *Blood Rev* 2015; 29: 81–91.
4. Moreau P, van de Donk N, San Miguel J et al. Practical considerations for the use of Daratumumab, a novel CD38 monoclonal antibody, in myeloma. *Drugs* 2016; 76: 853–867.
5. Oostendorp M, Lammerts van Bueren J, Doshi P et al. When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion* 2015; 55: 1555–1562.
6. Chari A, Satta T, Tayal A et al. Outcomes and management of red blood cell transfusions in multiple myeloma patients treated with daratumumab. *Blood* 2015; 26: Abstr 3571.

7. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 22.04.2014 №183н г. Москва. Об утверждении перечня лекарственных средств для медицинского применения, подлежащих предметно-количественному учету. Доступно по адресу: <https://rg.ru/2014/08/05/lekarstva-dok.html>.
8. Chapuy C, Nicholson R, Aguad M et al. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion* 2015; 55:1545–1554.
9. Darzalex package insert. Horsham, PA: Janssen Biotech, 2015. Доступно по адресу: <http://www.darzalex.com/shared/product/darzalex/darzalex-prescribing-information.pdf> (по состоянию на 7 января 2016 г.).
10. Chapuy C, Aguad M, Nicholson R et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion* 2016; 56:2964–2972.
11. Berthelie V, Laboureau J, Boulla G et al. Probing ligand-induced conformational changes of human CD38. *Eur J Biochem* 2000; 267:3056–3064.
12. Guida L, Franco L, Zocchi E et al. Structural role of disulfide bridges in the cyclic ADP-ribose related bifunctional ectoenzyme CD38. *FEBS Lett* 1995; 368:481–484.
13. Fung MK, Grossman BJ, Hillayer CD, Westhoff CM, eds. *Technical Manual*. 18th ed. —AABB PressM, 2014. Method 3.18.
14. Sullivan HC, Gerner-Smidt C, Nooka AK et al. Daratumumab (anti-CD38) induces loss of CD38 on red blood cells. *Blood* 2017; 129:3033–3037.
15. Velliquette RW, Shakarian G, Jhang J et al. Daratumumab-derived anti-CD38 can be easily mistaken for clinically significant antibodies to Lutheran antigens or to Knops antigens (abstract). *Transfusion* 2015; 55:26A.
16. Aye T, Arndt PA, Leger RM et al. Myeloma patients receiving daratumumab (anti-CD38) can appear to have an antibody with Lutheran-related specificity (abstract). *Transfusion* 2015; 55:28A.
17. Hannon JL, Caruk B, Clarke G. Serological findings related to treatment with a human monoclonal antibody (daratumumab) in patients with advanced plasma cell myeloma (abstract). *Transfusion* 2014; 54:162A.