

ISSN 2072-0505

№ 30'14

научно-практический журнал

# АЛЪМАНАХ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

актуальные вопросы нефрологии

актуальные вопросы гемокоррекции

инновационные технологии в медицине

обзоры и лекции



## ЗАГОТОВКА И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ЭРИТРОЦИТОВ И ТРОМБОЦИТОВ

*И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров, А.С. Глухов, И.А. Тюрин, А.Е. Ключев, В.Б. Хватов*

*ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва*

В статье представлены результаты оценки качества и клинической эффективности криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов. Показано, что размороженные эритроциты и тромбоциты соответствуют как отечественным, так и зарубежным стандартам качества компонентов крови.

**Ключевые слова:** криоконсервирование тромбоцитов, криоконсервирование эритроцитов, диметилсульфоксид, карантинизация компонентов крови, тромбоцитопения, анемия.

### PREPARATION AND CLINICAL ADMINISTRATION OF THE CRYOPRESERVED RED BLOOD CELLS AND PLATELETS

*I.V. Vysochin, E.N. Kobzeva, M.S. Makarov, A.S. Glukhov, I.A. Tyurin, A.E. Klyuev, V.B. Khvatov*

*N.V. Sklifosovsky State Budgetary Scientific Research Emergency Aim Institute, Moscow*

Assessment results of the quality and clinical efficiency of cryo-preserved erythrocytes and platelets are presented in the article. It is shown that unfrozen erythrocytes and platelets are in line with both the national and foreign standards of the blood components quality.

**Key words:** cryopreservation of platelets, cryopreservation of red blood cells, dimethyl sulfoxide, keeping the blood components in quarantine, thrombocytopenia, anemia.

Клеточные компоненты крови востребованы для лечения больных с анемией и тромбоцитопенией, которые развиваются на фоне массивной кровопотери при политравме, а также после химио- и лучевой терапии. В настоящее время в США ежегодно проводится 1,5 млн переливаний тромбоцитных концентратов (ТК), а в странах Европы – 2,9 млн [22]. В РФ заготавливается около 500 тыс. ТК в год. Эритроцитсодержащие компоненты (ЭК) более востребованы. В РФ в 2012 г. было заготовлено около 2 млн доз эритроцитов, дефицит составил около 1,4 млн доз [1]. За период с 2002 по 2009 г. отмечался рост заготовки замороженной эритроцитарной массы с 43 139 до 68 861,7 дозы [7].

Основной причиной возросшей потребности в ТК является возможность с помощью трансфузии тромбоцитов значительно снизить летальность, обусловленную тромбоцитопеническим геморрагическим синдромом у больных с различной патологией (гемобластозы, апластическая анемия, злокачественные новообразования, лучевая болезнь и т.д.). Трансфузии ТК позволяют проводить интенсивную полихимиотерапию; способствуют разработке и совершенствованию интенсивных лечебных программ в гематологии, онкологии, трансплантологии; помогают осуществлять оперативные вмешательства в сердечно-сосу-

дистой хирургии, ортопедии, травматологии и т.д. [2, 3, 19, 24].

Производство ТК трудоемко, сложно планируется из-за короткого времени хранения (до 5 суток). Современные технологии позволяют получать ТК как из дозы крови, так и методом афереза, и хранить при температуре от 20 до 24 °С при постоянном перемешивании. Однако короткий срок хранения не позволяет карантинизировать тромбоциты, а технология вирусинактивации ТК снижает функциональную активность тромбоцитов [20]. Качество ТК начинает снижаться уже через трое суток хранения, что и обуславливает их низкую клиническую эффективность [13]. В экстренных случаях трансфузия ТК сопряжена с трудностями, в первую очередь связанными с отсутствием эффективных методов их долгосрочного хранения. В связи с широким использованием переливания тромбоцитов возникли серьезные проблемы: развитие аллоиммунизации и рефрактерности больных к трансфузиям, риск передачи опасных гемотрансмиссивных инфекций (вирусные гепатиты, ВИЧ и др.), развитие трансфузионных реакций и осложнений [12, 18].

Заготовка ЭК менее затратна, чем ТК, однако требует тщательного подбора по антигенам эритроцитов, что не всегда доступно. Несмотря на тщательность



обследования донора, сохраняется риск передачи реципиенту с компонентами крови опасных инфекций. Исключение этого риска реализовано путем проведения карантинизации, внедренной при заготовке свежезамороженной плазмы. Технология карантинизации предусматривает повторный анализ крови донора через 180 суток после заготовки для выявления маркеров инфекции (HIV, HBV, HCV), которые не могли быть выявлены ранее из-за «серонегативного окна» [6]. Эта технология может быть реализована при условии замораживания и длительного хранения компонента. В настоящее время только плазма проходит карантинизацию, т.к. подвергается заморозке. Ни эритроциты, ни тромбоциты короткого хранения не могут быть карантинизированы, а значит, заведомо несут риск передачи инфекции.

Криоконсервирование и долгосрочное хранение эритроцитов и тромбоцитов позволяют решить эти проблемы. Благодаря технологии замораживания возможно провести дополнительное обследование на наличие возбудителей инфекционных заболеваний, исключить бактериальную контаминацию при хранении, создать банки аутологичных, а также HLA- и HPA-типированных аллогенных тромбоцитов, транспортировать гемокомпоненты на большие расстояния [21, 24]. Кроме того, наличие банка криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов может значительно облегчить существующие в настоящее время организационные трудности обеспечения растущих потребностей клиник в гемокомпонентах, придать гибкость учреждениям службы крови в управлении ресурсами. Криоконсервирование позволяет продлить срок хранения ТК и ЭК до нескольких лет [16, 23].

В НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского внедрена аппаратная технология криоконсервирования эритроцитов, а также разработана методика замораживания тромбоцитов с использованием комбинированного криопротектора.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для криоконсервирования эритроцитов и тромбоцитов заготовили 907 доз ЭК и 60 – ТК. ЭК получали из венозной крови здоровых доноров. После кроводачи кровь центрифугировали, удаляли плазму и лейкоцитарный слой. Полученную эритроцитную массу ресуспендировали в SAGM и хранили при температуре от +2 до +6 °С не более 5 суток до криоконсервирования. Криоконсервировали ЭК с криопротектором Glycerol 57%. Глицеролизацию проводили в закрытом контуре на аппарате Haemonetics ACP 215. Замораживали глицеролизованные ЭК при температуре -85 °С, полученные криоконсервированные эритроциты (КЭ) хранили при -196 °С в жидком азоте. ТК получали аферезным методом на сепараторе крови Trima Accel. Заготовленный ТК хранили при

температуре от +20 до +24 °С и постоянном перемешивании не более 24 часов до замораживания. Криоконсервировали ТК с комбинированным криопротектором Dimethylsulfoxide/dextran 40 solution 5 ml. При добавлении криопротектора в суспензию тромбоцитов конечная концентрация диметилсульфоксида перед замораживанием составляла 5%. В среднем для приготовления одной дозы криоконсервированных тромбоцитов (КТ) требовалось 2 мл криопротектора. Затем ТК замораживали со скоростью 2-3 °С/мин. Полученные КТ хранили при -196 °С в жидком азоте.

Карантинизацию КЭ и КТ проводили по аналогии с плазмой путем повторного обследования доноров на HCV и HBV через 180 суток, размораживали при 37 °С в размораживателе Barkey Plasmatherm. Размороженные эритроциты (РЭ) деглицеролизировали на аппарате Haemonetics ACP 215 в закрытом контуре с помощью официальных 0,9 и 12% растворов NaCl. Отмытые эритроциты разводили в SAGM. Размороженные тромбоциты ресуспендировали в плазме.

Контроль качества РЭ проводили по следующим параметрам: объем РЭ, содержание эритроцитов и лейкоцитов, гематокрит, гемоглобин, осмолярность, гемоглобин надосадовой жидкости. Качество размороженных тромбоцитов (РТ) оценивали по объему РТ, содержанию тромбоцитов, лейкоцитов и ФАТ, осмолярности, pH, концентрации диметилсульфоксида. Количество ФАТ до замораживания и после размораживания ТК определяли методом витального окрашивания<sup>1</sup>. Количество диметилсульфоксида в ТК определяли на газовом хроматографе Shimadzu GC-17A (Япония) с пламенно-ионизационным детектором и автосамплером [11].

#### Статистическая обработка полученных данных

Значение показателей, полученных в результате работы, проанализировали, используя статистические методы. Провели точечные (среднее) и интервальные (доверительный интервал) оценки параметров экспериментальных выборок. На основе t-статистики (t-критерий Стьюдента) проверили гипотезу о совпадении точечных оценок.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В отделении производственной трансфузиологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского за период с 2011 по 2013 г. было заготовлено 907 доз КЭ и 60 – КТ (рис. 1). Размороженные и отмытые эритроциты характеризовались следующими параметрами: объем  $312 \pm 2,6$  мл, количество эритроцитов  $1,5 \pm 0,2 \times 10^{12}$ /дозе, гематокрит  $40,1 \pm 4,8\%$ , гемоглобин  $47,7 \pm 4,9$  г/дозе, осмолярность  $351,6 \pm 16,8$  мОсмоль/л, гемоглобин надосадовой жидкости – менее 0,16 г/дозе. Большая часть РЭ, которые перелили больным, прошли карантинизацию – 291 доза (58%). Количество некарантинизированных КЭ составило 121 дозу (24%). Остальные КЭ

1. Патент РФ №2485502 от 20.06.2013.



– 83 (17%) – были условно карантинизированы карантинизированы при повторном обследовании донора,

но уже после трансфузии РЭ (рис. 2). Только 6 доз из 500 не прошли карантинизацию и были утилизированы.

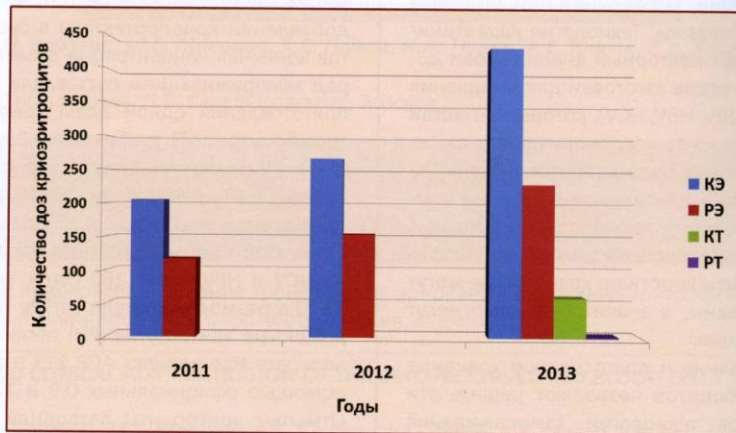


Рис. 1. Заготовка криоэритроцитов с 2011 по 2013 г.



Рис. 2. Заготовка криоэритроцитов с 2011 по 2013 г.

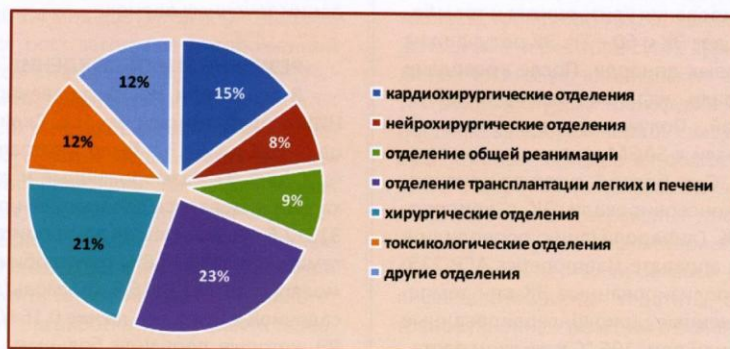


Рис. 3. Потребность клинических отделений НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в КЭ в 2013 г.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ГЕМОКОРРЕКЦИИ



Все трансфузии КЭ имели клиническую эффективность, проявляющуюся в увеличении количества гемоглобина, гематокрита и эритроцитов в крови больных.

Приводим клинические наблюдения.

Больному Б. 52 лет с диагнозом хронический калькулезный панкреатит, острая язва желудка, эрозивно-геморрагический энтерит, язва сигмовидной кишки, полипы сигмовидной кишки, провели многократные трансфузии ЭК – 25 доз (из них 8 – КЭ) и свежезамороженной плазмы – 44 дозы. Трансфузии всех компонентов крови прошли без реакций и осложнений.

Больной М. 34 лет с диагнозом лимфангиолейомиоматоз легких, хроническая дыхательная недостаточность III степени, состояние после трансплантации легких, провели терапию ЭК – 15 доз (из них 6 – криоконсервированных карантинизированных эритроцитов) и свежезамороженной плазмы – 37 доз. Учитывая тяжесть больной по основному заболеванию, а также высокотехнологичное лечение (органная трансплантация), переливали размороженные и отмытые карантинизированные эритроциты, подобранные по группе крови и фенотипу. Такой подход позволил исключить аллоиммунизацию больной, передачу опасных вирусных инфекций и развитие острого повреждения легких, связанного с переливанием крови.

Качество ТК, полученных методом афереза, характеризовалось следующими параметрами: объем  $200 \pm 5$  мл, количество тромбоцитов  $220 \pm 10 \times 10^9$ /дозе, количество лейкоцитов не более  $1,0 \times 10^6$ /дозе. Дополнительно определяли содержание ФАТ, которое составляло  $55 \pm 4\%$  от общего числа тромбоцитов. После размораживания КТ содержание тромбоцитов было  $80 \pm 5\%$ , а ФАТ –  $50 \pm 5\%$  от исходного. Осмолярность РТ –  $360 \pm 6$  мОсмоль/л. Объем РТ оставался прежним –  $200 \pm 5$  мл, а pH соответствовал исходному ТК и составил  $7,1 \pm 0,2$ . Сохранность тромбоцитов зависела от качества исходного компонента. Так, в ТК, содержащих исходно более 60% ФАТ, после криоконсервирования сохранилось не менее 50% ФАТ. Концентрация диметилсульфоксида в РТ (не более 0,7%) была нетоксичной и не требовала удаления криопротектора. Только дозы из 60 КТ не прошли карантинизацию и были карантинизованы. После переливания РТ не выявлено посттрансфузионных реакций или осложнений и отмечен быстрый гемостатический эффект.

Приводим клиническое наблюдение.

Больному Х. 72 лет с диагнозом подострый инфекционный эндокардит аортального клапана, состояние после операции – протезирование аортального клапана с интраоперационной кровопотерей 2500 мл, выраженным геморрагическим синдромом, тромбоцитопенией и анемией про-

ведена трансфузия одной лечебной дозы РТ, совместимых по группе крови и резус-фактору, после чего посттрансфузионных реакций и осложнений не выявлено. Геморрагический синдром купирован. Скорректированное число прироста тромбоцитов на 1-й и 24-й час после окончания трансфузии составило 26 и 6,1 соответственно, что сопоставимо с эффективностью ТК первых двух суток хранения.

В результате проведенной работы показано, что размороженные эритроциты и тромбоциты отвечают как отечественным, так и зарубежным стандартам качества компонентов крови [8, 9]. Криоконсервированные эритроциты и тромбоциты проведено с использованием разрешенных в РФ криопротекторов Glycerol 57% и Dimethylsulfoxide/dextran 40 solution 5 ml. Размороженные и отмытые в замкнутом контуре эритроциты имели высокое содержание эритроцитов и гемоглобина. За счет многократного отмывания эритроциты не содержали донорского плазменного компонента, что позволило получить донорские иммунологически безопасные гемокомпоненты. Основным показанием для трансфузии эритроцитов является восстановление или поддержание кислородотранспортной функции крови для обеспечения потребностей тканей [5]. Переливание РЭ позволило повысить концентрацию гемоглобина и компенсировать анемию, тем самым восстановив кислородотранспортную функцию крови. Размороженные и отмытые донорские эритроциты не содержали донорских лейкоцитов, что исключило аллоиммунизацию больных при проведении длительной гемотерапии и соответствовало правилам клинической трансфузиологии [10].

Качество РТ, замороженных по оригинальной методике, разработанной в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, было высоким. Для определения содержания ФАТ в КТ использована методика оценки морфофункционального статуса тромбоцитов. Использование морфологических критериев оценки функциональной пригодности тромбоцитов обоснованно, что подтверждается данными литературы. Так, А.В. Мазуров утверждает, что биологическая активность и функциональная полноценность тромбоцитов напрямую зависят от их морфологической целостности, поэтому наиболее достоверными методами оценки качества тромбоцитов считаются морфометрические и цито-морфометрические [4].

При криоконсервировании ТК особое внимание должно быть уделено токсичности диметилсульфоксида. Гиперосмолярность криопротектора на его основе, которая достигает 1200 мОсмоль/л при концентрации диметилсульфоксида 5%, значимо снижает качество тромбоцитов. В отличие от эритроцитов, которые выдерживают осмолярность около 1500 мОсмоль, тромбоциты теряют до половины функциональных свойств при 800 мОсмоль/л. Низкая концентрация диметил-



сульфоксида в РТ, достигнутая дилуцией тромбоцитов плазмой, позволила сохранить ФАТ.

Слабая токсичность низких концентраций диметилсульфоксида подтверждена исследованиями, проведенными L. Asmis и соавт. Они показали, что после инкубирования тромбоцитов с 0,5% раствором диметилсульфоксида в течение 30 минут агрегационная активность тромбоцитов не менялась при действии агонистов аденозиндифосфата ( $10^{-5}$ , 1,25 мкМ), коллагена ( $10^{-5}$ , 1,25 мг/мл), эпинефрина ( $10^{-5}$ , 1,25 мкМ) и ристоцетина (1,25, 0,62 мг/мл) [14]. При этом авторы отмечали снижение циклооксигеназной активности на 36% по сравнению с контролем, что можно компенсировать введением экзогенного тромбоксана А<sub>2</sub>. Учитывая хорошую переносимость трансфузий гемопэтических стволовых клеток, содержащих 1,6% диметилсульфоксид (20,0 ммоль/л), его оптимальная концентрация – 0,7% – получаемая после дилуции ТК плазмой, является релевантной [26]. В работе G.G. Samici и соавт. даже бо́льшая концентрация диметилсульфоксида – 1% – нетоксична для эндотелиальных клеток человека, гладкомышечных клеток и моноцитов крови [15].

Внедрение технологии криоконсервирования клеточных компонентов крови в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского позволило создать резерв безопасных и эффективных компонентов крови длительного хранения.

#### ВЫВОДЫ

Технологии криоконсервирования эритроцитов и тромбоцитов гарантируют производство безопасных клеточных компонентов крови надлежащего качества с высокой клинической эффективностью и безопасностью при трансфузии. Все процедуры проходят в закрытом стерильном контуре на сертифицированном оборудовании, что позволяет исключить контаминацию компонентов крови. Многократное отмывание эритроцитов позволяет удалить не только криофлактин, но также донорские лимфоциты и плазменный компонент, что исключает аллоиммунизацию реципиента после трансфузии. Замораживание и длительное хранение эритроцитов и тромбоцитов дают возможность проводить карантинизацию, что снижает риск передачи гемотрансмиссивных инфекций реципиентам. Внедрение технологии криоконсервирования позволяет создать стратегический запас эритроцитов и тромбоцитов, обеспечить их длительное хранение и возможность карантинизации для бесперебойного снабжения медицинских учреждений безопасными гемокомпонентами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жибурт Е.Б., Белоусов Д.Ю., Шестаков Е.А., Белоусов Ю.Б. Фармакоэкономический анализ применения Гемопюра® в условиях плановых ортопедических операций // Кач. клин. практ. 2012. №1. С.44-55.
2. Компаниец А.М., Николенко А.В., Луговой В.И. Криоконсервирование тромбоцитов с веществами ряда полиолов // Труды Междунар. конф. по криобиол. Харьков, 1992. С.86.
3. Лебедева Е.А., Ефимова С.Ю. Клиническая эффективность концентрата тромбоцитов у гематологических больных // Пробл. гематол. перелив. крови. 2000. №2. С.27-28.
4. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. М., 2011. 480 с.
5. Приказ Минздрава РФ от 25.11.2002 №363 «Об утверждении Инструкции по применению компонентов крови».
6. Приказ Минздрава РФ от 07.05.2003 №193 (ред. от 19.03.2010) «О внедрении в практику работы службы крови в Российской Федерации метода карантинизации свежезамороженной плазмы».
7. Селиванов Е.А., Данилова Т.Н., Дегтерева И.Н. и др. Служба крови России: современное состояние и перспективы развития // Трансфузиология. 2010. №4. С.4-31.
8. Совет Европы. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови. 2010. 16-е издание. 490 с.
9. Технический регламент о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии. Утвержден постановлением Правительства РФ №29 от 26.01.2010.
10. Точенов А.В., Козинец Г.И. Справочник-пособие по клинической трансфузиологии. М.: Триада-Х, 1998. 44 с.
11. Тюрин И.А., Ключев А.Е., Высочин И.В. Методика газохроматографического определения диметилсульфоксида и возможности применения ее в медицине // Тезисы докл. на VI Научно-практической конференции. Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ. М., 2013. С.42-43.
12. Agranenko V.A., Kompaniets A.M. Factors influencing the efficacy of platelet transfusion therapy // Proceedings of XXIII Congress of ISBT. Amsterdam, 1994. P.94.
13. Albanyan A.M., Sukhu K., Harrison P. Evaluation of the PDQ centrifuge for preparing platelet rich, platelet poor and platelet free plasma samples for light transmission aggregometry and microparticle measurement // Platelets. 2009. V.20, No.8. P.610-612.



14. *Asmis L., Tanner F.C., Sudano I.* et al. DMSO inhibits human platelet activation through cyclooxygenase-1 inhibition. A novel agent for drug eluting stents? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. V.391, Issue 4. P.1629-1633.
15. *Camici G.G., Steffel J., Akhmedov A.* et al. Dimethyl Sulfoxide Inhibits Tissue Factor Expression, Thrombus Formation, and Vascular Smooth Muscle Cell Activation: A Potential Treatment Strategy for Drug-Eluting Stents. *Circulation*. 2006. No.114. P.1512-1521.
16. *Dumont L.J., Cancelas J.A., Dumont D.F.* et al. A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethylsulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers // *Transfusion*. 2013. V.53, No.1. P.128-137.
17. *Egorin M.J., Rosen D.M., Sridhara R.* et al. Plasma concentrations and pharmacokinetics of dimethylsulfoxide and its metabolites in patients undergoing peripheral-blood stem-cell transplants // *J. Clin. Oncol*. 1998. V.16, No.2. P.610-615.
18. *McCulloch J., Vesicle D.V., Benjamin P.J.* et al. Therapeutic efficacy and safety of platelet treated with a photochemical process for pathogen inactivation the Sprint Trial // *Blood*. 2004. V.104, No.5. P.1534-1542.
19. *Pedrazzoli P., Perotti C., Noris P.* et al. Autologous platelet transfusion in patients receiving high-dose chemotherapy and circulating progenitor cell transplantation for stage II/III breast cancer // *Haematologica*. 1998. V.83, No.8. P.718-723.
20. *Reesink H.W., Panzer S., McQuilten Z.K.* et al. Pathogen inactivation of platelet concentrates // *Vox Sang*. 2010. V.99, No.1. P.85-95.
21. *Slichter S.J.* Platelet transfusion: future directions // *Vox Sang*. 2004. V.8, Suppl.2. P.47-51.
22. *Stroncek D.F., Rebutta P.* Platelets transfusions // *Lancet*. 2007. No.4. P.427-438.
23. *Valeri C.R., Rango G.* The survival and function of baboon red blood cells, platelets, and plasma proteins: a review of the experience from 1972 to 2002 at the Naval Blood Research Laboratory // *Transfusion*. 2006. V.46, Suppl.8. P.1-42.
24. *Yokomuro M., Ebine K., Shiroma K.* et al. Safety and efficacy of autologous platelet transfusion in cardiac surgery: comparison of cryopreservation, blood collection on the day before surgery and blood collection during surgery // *Cryobiology*. 1999. V.38, No.3. P.236-242.