

На правах рукописи

Азимова Мухайёхон Ходжиевна

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ОБРАБОТКИ И СРЕДЫ СУСПЕНДИРОВАНИЯ
КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ НА ИХ КАЧЕСТВО И КЛИНИЧЕСКУЮ
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСФУЗИЙ

14.01.21 – гематология и переливание крови

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России.

Научные руководители:

доктор медицинских наук **Галстян Геннадий Мартинович**
кандидат медицинских наук **Гапонова Татьяна Владимировна**

Официальные оппоненты:

Салимов Эмин Львович – доктор медицинских наук, заведующий отделом заготовки крови и её компонентов Центра крови Клинического Центра, доцент кафедры анестезиологии и реаниматологии лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России

Парамонов Игорь Владимирович – доктор медицинских наук, директор Кировского научно – исследовательского института гематологии и переливания крови Федерального медико – биологического агентства

Ведущая организация: Научно - исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт – Петербургский государственный университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России

Защита состоится «_____» _____ 2018 года в... часов на заседании диссертационного совета Д208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу:

125167, г. Москва, Новый Зыковский проезд, 4

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации и на сайте www.blood.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Сысоева Елена Павловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Программу противоопухолевой химиотерапии невозможно реализовать без интенсивной поддерживающей терапии, важным звеном которой является трансфузия компонентов донорской крови и, прежде всего, концентратов тромбоцитов (КТ) [Савченко В.Г., 2006; Савченко В.Г., 2014]. Однако КТ являются опасной трансфузионной средой, поскольку из-за короткого срока хранения и интервала между донациями карантинизация их невозможна, а хранение при комнатной температуре не позволяет исключить рост микроорганизмов в случае контаминации. Опасность представляет собой содержание в КТ донорской плазмы, которая может быть источником гемотрансмиссивных инфекций и причиной аллергических реакций, активации системы комплемента и т.д. [Гармаева Т.Ц., 2012; Vetlesen A., 2013].

Повысить безопасность трансфузий КТ позволяет обработка уже полученных КТ, которая включает в себя инактивацию патогенов и замещение 70-80% донорской плазмы добавочным раствором. Добавочные растворы позволяют сохранить целостность мембраны тромбоцитов, поддерживать рН в среде в течение всего срока хранения КТ и в то же время снижают риск аллоиммунизации [Gulliksson H., 2003]. Фотохимическая инактивация патогенов с применением амотосалена и ультрафиолетового облучения спектра А (УФА) приводит к тому, что молекула амотосалена проникает и встраивается между пиримидиновыми основаниями нуклеиновых кислот патогенов, образуя под воздействием этих лучей, перекрестную связь и блокируя дальнейшую репликацию ДНК или РНК вирусов, бактерий и простейших [Lin L., 2004]. В литературе мало работ, посвященных влиянию технологии инактивации патогенов на качество и клиническую эффективность КТ, суспендированных в аддитивных растворах, а также оценке эффективности в зависимости от сроков хранения.

Таким образом, вопрос сохранения функциональной активности тромбоцитов после проведения редукции патогенов и использования добавочных растворов остается открытым.

Степень разработанности темы исследования

Jean-Louis H Kerkhoffs с соавт. [Jean-Louis H Kerkhoffs, 2010] показали, что КТ, суспендированные как в плазме, так и в растворе SSP+ (platelet storage solution), после инактивации патогенов обладают равной эффективностью при лечении геморрагического синдрома по сравнению с КТ без инактивации патогенов. Однако эти данные основаны на оценке количественного прироста тромбоцитов и уменьшении клинических проявлений геморрагического синдрома. Работ, в которых оценивали эффективность трансфузий КТ методом тромбоэластографии (ТЭГ), в литературе мало. Таким образом, существующие в литературе данные о качестве и клинической эффективности КТ, суспендированных в растворе SSP+ и в донорской плазме, подвергшихся инактивации патогенов, единичные, и требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования

Изучить влияние различных методов обработки концентратов тромбоцитов, суспендированных в донорской плазме или в добавочном растворе, на качество и клиническую эффективность их трансфузий.

Задачи исследования

1. Определить изменения биохимических показателей КТ в процессе хранения, суспендированных в плазме или добавочном растворе, подвергнутых редукции патогенов и без обработки.
2. Сравнить изменения маркеров активации тромбоцитов, в процессе хранения КТ, суспендированных в плазме или добавочном растворе, подвергнутых редукции патогенов и без обработки.
3. Оценить эффективность трансфузий КТ, суспендированных в плазме или в добавочном растворе, подвергнутых редукции патогенов или рентгеновскому облучению по параметрам количественного прироста тромбоцитов.
4. Оценить эффективность трансфузий КТ, суспендированных в плазме или в добавочном растворе, подвергнутых редукции патогенов или рентгеновскому облучению с помощью тромбоэластографии.
5. Выявить факторы, влияющие на эффективность трансфузий КТ.

Научная новизна

Впервые дана оценка клинической эффективности трансфузий КТ, методом ТЭГ с помощью таких параметров, как МА, МА_{FF} и МА_{PL}. Показана роль КТ в гемостатическом эффекте. Эффективность трансфузий КТ проявлялась увеличением максимальной амплитуды (МА), что свидетельствует об увеличении плотности сгустка, обусловленное улучшением функции и количества тромбоцитов. Тромбоэластографическая оценка эффективности трансфузий проведена при переливании КТ с различными сроками хранения, суспендированных в плазме или в растворе SSP+, после инактивации патогенов или рентгеновского облучения. Показано, что КТ, подвергнутые редукции патогенов, обладают равной эффективностью с КТ, подвергнутыми рентгеновскому облучению, а трансфузии КТ, суспендированных в добавочном растворе, столь же эффективны, как КТ, суспендированных в плазме.

Выявлены факторы, влияющие на эффективность трансфузий: время хранения и синдром повышенного потребления тромбоцитов (ППТ). Метод обработки и среда суспендирования не влияли на эффективность трансфузий КТ. Оценка эффективности трансфузий КТ с помощью ТЭГ показала, что даже при небольшом количественном приросте тромбоцитов крови, при достижении целевых значений МА обеспечивался гемостатический эффект.

Теоретическая и практическая значимость

Применение нового подхода к оценке эффективности трансфузий КТ методом ТЭГ позволяет оценить эффективность трансфузии при недостаточном количественном приросте тромбоцитов крови. Практическая значимость работы состоит в том, что на основании полученных результатов оценки качества и клинической эффективности трансфузий рекомендовано применение КТ, суспендированных в растворе SSP+ и обработанных амотосаленом и УФА, реципиентам множественных трансфузий. Показано, что эффективность трансфузий у больных с синдромом ППТ снижается в трети случаев после трансфузии КТ, хранимых более 3 дней.

Методология и методы исследования

Методологической и теоретической основой диссертационного исследования послужили труды отечественных и зарубежных исследователей в области

трансфузиологии, гематологии, интенсивной терапии, а также исследования *in vitro*, изучавшие биохимические и функциональные особенности клеток крови.

Положения, выносимые на защиту

1. Редукция патогенов амотосаленом в сочетании с ультрафиолетовым облучением спектром А не снижает качество КТ, суспендированных в 100% плазме или в смеси плазмы (30%) и аддитивного раствора SSP+ (70%). Замещение в концентратах тромбоцитов 70% плазмы раствором SSP+ лучше сохраняло свойства тромбоцитов по мере хранения по сравнению с КТ, суспендированными только в плазме, приводя к меньшей утилизации глюкозы, меньшему образованию лактата и сохранению резидуальной функциональной активности тромбоцитов.
2. Редукция патогенов амотосаленом в сочетании с ультрафиолетовым облучением спектром А и рентгеновское облучение не снижают клиническую эффективность концентратов тромбоцитов, заготовленных в 100% донорской плазме или в смеси плазмы (30%) и аддитивного раствора SSP+ (70%). Факторами, снижающими эффективность трансфузий концентратов тромбоцитов, вне зависимости от метода обработки и среды суспендирования, являются время хранения и синдром повышенного потребления тромбоцитов у больного.
3. Эффективность трансфузий концентратов тромбоцитов может быть подтверждена с помощью тромбоэластографии. После трансфузии концентрата тромбоцитов, даже при отсутствии количественного прироста тромбоцитов крови, может быть достигнут гемостатический эффект, если на тромбоэластограмме регистрируется увеличение максимальной амплитуды ≥ 44 мм.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность и обоснованность выводов, полученных в результате исследования, подтверждается использованием соответствующей методологии, изучением достаточного объема научной литературы, нормативной базы, а также оперированием эмпирическими данными, собранными в процессе работы над диссертационным исследованием.

Полученные результаты представлены на ведущих отечественных и зарубежных конгрессах и конференциях в виде устных и стендовых докладов: II Московской конференции специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва,

2016 г.), VII Региональном конгрессе ISBT (Копенгаген, 2017 г.), IV Конгрессе гематологов России (Москва, 2018 г.). Апробация диссертации состоялась на объединенном заседании проблемных комиссий «Клинические исследования в гематологии, трансфузиологии, патологии гемостаза, хирургической гематологии, анестезиологии и интенсивной терапии»; «Фундаментальные исследования в гематологии, трансплантологии, трансфузиологии»; «Проблемы донорства, производства и контроля качества компонентов и препаратов крови, разработки средств воздействия на систему крови» ФГБУ «НМИЦ Гематологии» Минздрава России 19 июня 2018 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 раздел в книге, 8 тезисов.

Объем и структура диссертации

Работа изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Текст иллюстрирован 18 таблицами и 27 рисунками. Список литературы включает 23 отечественных и 136 зарубежных источников.

Работа выполнена в ФГБУ «НМИЦ гематологии» МЗ РФ (генеральный директор – акад. РАН проф., д.м.н. Савченко В.Г.). ТЭГ проводили в экспресс-лаборатории отделения реанимации и интенсивной терапии (зав. – д.м.н. Галстян Г.М.). Маркеры активации тромбоцитов исследовали в лаборатории иммунофенотипирования клеток крови и костного мозга (зав. – к.м.н. Гальцева И.В.). Изменения биохимических параметров КТ исследовали в испытательной лаборатории отдела экспертизы контроля и изучения качества эффективности и безопасности средств трансфузионной и инфузионной терапии (зав.– д.б.н. профессор Карякин А.В.). Бактериальный контроль КТ проводили в отделе вирусологической диагностики (зав. – к.м.н. Туполева Т.А.). КТ заготавливали в отделении заготовки крови и компонентов (руководитель - заместитель Генерального директора по трансфузиологии к.м.н., Гапонова Т.В., зав. – Булгаков А.В.). Трансфузии КТ осуществляли пациентам клинических отделений ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России.

Содержание работы

Материалы и методы

На первом этапе исследования сравнивали биохимические параметры (рН, содержание глюкозы, лактата и цитрата) и функциональную активность тромбоцитов в 4 типах КТ: 1) КТ, суспендированных в плазме (КТ_{ПЛАЗМА}), 2) патогенредуцированных КТ (ПРКТ), суспендированных в плазме (ПРКТ_{ПЛАЗМА}), 3) КТ, суспендированных в растворе SSP+ (КТ_{SSP+}), 4) ПРКТ, суспендированных в растворе SSP+ (ПРКТ_{SSP+}). Образцы КТ исследовали в 1, 3, 5 и 7 дни хранения (рис. 1).

На втором этапе исследования (рис. 1) оценивали эффективность трансфузий КТ 4 типов: 1) рентгеноблученных КТ (РОКТ), суспендированных в плазме (РОКТ_{ПЛАЗМА}); 2) ПРКТ_{ПЛАЗМА}; 3) РОКТ, суспендированные в растворе SSP+ (РОКТ_{SSP+}); 4) ПРКТ_{SSP+}. Эффективность трансфузии КТ определяли по абсолютному приросту тромбоцитов (АПТ) и скорректированному приросту тромбоцитов (СПТ) через 1 и 24 ч после трансфузии, изменениям ТЭГ (параметры МА, МА_{FF} через 1 ч после трансфузии), интервалу между трансфузиями (ИМТ), выраженности геморрагического синдрома по ВОЗ. Оценивали эффективность трансфузий всех видов КТ при разных сроках хранения.

Характеристика реципиентов и доноров. В исследование включено 122 реципиента (65 мужчины, 57 женщин) в возрасте 17-75 (медиана - 36) лет, получивших КТ. Апластической анемией страдали 20 (16,2%) больных, острыми лейкозами - 83 (67,4%), лимфопролиферативными заболеваниями - 11 (9%), множественной миеломой – 9 (7,3%).

Характеристика доноров КТ. КТ были заготовлены от 198 добровольных доноров мужчин в возрасте 18-56 (медиана 29) лет, концентрация тромбоцитов у них до донации была от 225 до 366 $\times 10^9$ /л (медиана 247 $\times 10^9$ /л).

Сбор и обработка тромбоцитов. Сбор тромбоцитов проводили на сепараторе Trima Accel (“Cardian”, США). КТ для первого этапа исследования заготавливали в объеме 600 мл в дозе 8×10^{11} клеток, для второго этапа – в объеме 330 ± 10 мл, в дозе 5×10^{11} клеток. Редукцию патогенов проводили амотосаленом до концентрации 150 мкМ+ УФА в дозе 3,6 Дж/см² («Blood System»). На втором этапе исследования проводили рентгеновское облучение (25–30 Гр) КТ, не подвергнутые редукции патогенов.

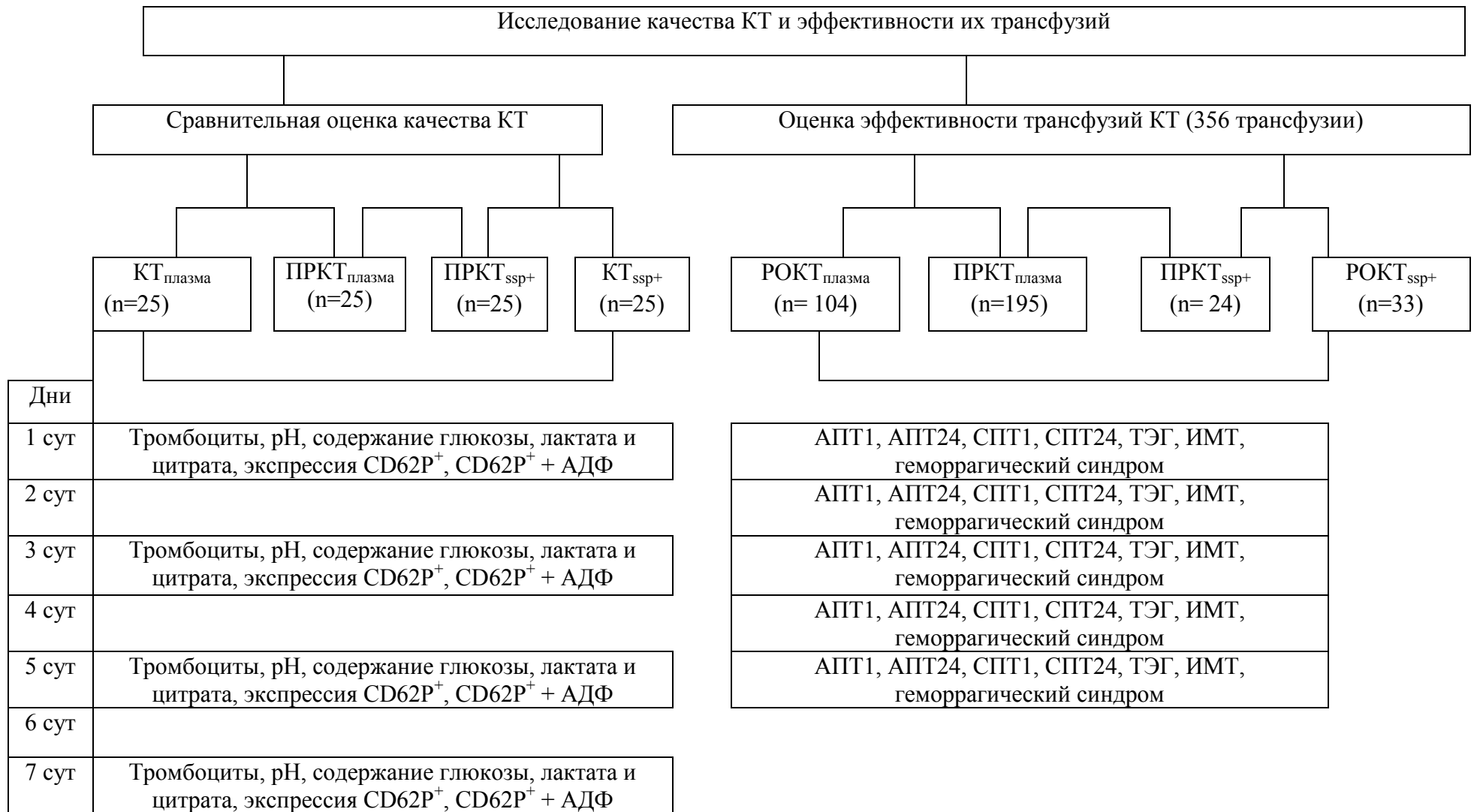


Рисунок 1 – Дизайн и объем исследования

Исследование биохимических параметров КТ. Биохимические параметры определяли в среде суспендирования тромбоцитов после их осаждения центрифугированием при 4°C на центрифуге Sigma 2-16K (“Sigma Laborzentrifugen”, Германия) при 5000 об/мин в течение 30 мин. pH измеряли с помощью микроэлектрода на pH-метре SevenMulti (“Mettler Toledo”). Концентрации глюкозы, лактата и цитрата измеряли ферментативным методом (“r-Biopharm”, Германия) на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”, Япония). Общее потребление глюкозы определяли по разнице концентраций глюкозы между 7 и 1 днями хранения, накопление лактата определяли по разнице концентраций между 7 и 1 днями хранения.

Исследование маркеров активации методом проточной цитофлуориметрии. Спонтанную активацию тромбоцитов в КТ оценивали по экспрессии P-селектина (антиген CD62P) на поверхности мембраны тромбоцитов. Определяли также долю тромбоцитов, связавшихся с антителом PAC-1 под действием аденозиндифосфата (АДФ). CD62P и PAC-1 исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Цитометрический анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Детекцию тромбоцитов выполняли по показателям бокового и прямого светорассеяния. Оценивали долю CD62P- и PAC-1-положительных тромбоцитов в пробе без добавления активатора (спонтанно активированные тромбоциты) и после активации с помощью АДФ (функционально активные тромбоциты - процент тромбоцитов, с которыми антитела PAC-1 связывались после активации АДФ).

Методы исследования клинической эффективности трансфузий КТ. До и после переливания КТ определяли количество тромбоцитов в периферической крови реципиентов на гематологическом анализаторе Sysmex-ХЕ-2100, (Япония) для расчета АПТ и СПТ. АПТ определяли по разнице количества тромбоцитов крови до и после трансфузии КТ. Эффективной считали трансфузию, если АПТ $>10 \times 10^9/\text{л}$, СПТ через 1 ч $\geq 7,5 \text{ PE}$, а через 24 часа $\geq 4,5 \text{ PE}$ СПТ рассчитывали по формуле:

$$\text{СПТ} = \frac{\text{АПТ} \times S}{\text{Количество перелитых тромбоцитов}}$$

Оценка эффективности трансфузий КТ с помощью ТЭГ. ТЭГ выполняли на анализаторе TEG-5000 (Haemonetics, США). Вклад тромбоцитов в формирование

сгустка определяли по максимальной амплитуде (МА) с цельной цитратной кровью. Эффективной считали трансфузию КТ, после которой МА составляло ≥ 44 мм.

Статистический анализ. Статистический анализ проведен с использованием статистического пакета IBM SPSS v.23 (США).

Результаты исследования

Исследование биохимических параметров сред суспендирования КТ после проведения инактивации патогенов при хранении до 7 дней

Исходные значение рН среды КТ_{ПЛАЗМА} в день сбора были 7,6 (7,5 – 7,6), а КТ_{SSP+} - 7,4 (7,3 – 7,4). В обоих типах образцов КТ, не подвергавшихся редукции патогенов, отмечена тенденция к увеличению рН на 3 день и последующее снижение к 7 дню. После редукции патогенов в ПРКТ_{ПЛАЗМА} и ПРКТ_{SSP+} на 3 день хранения отмечено снижение рН до 7,2 (6,7 – 7,5) и 7,0 (6,7 – 7,2), соответственно ($p < 0,05$) (рис. 2).

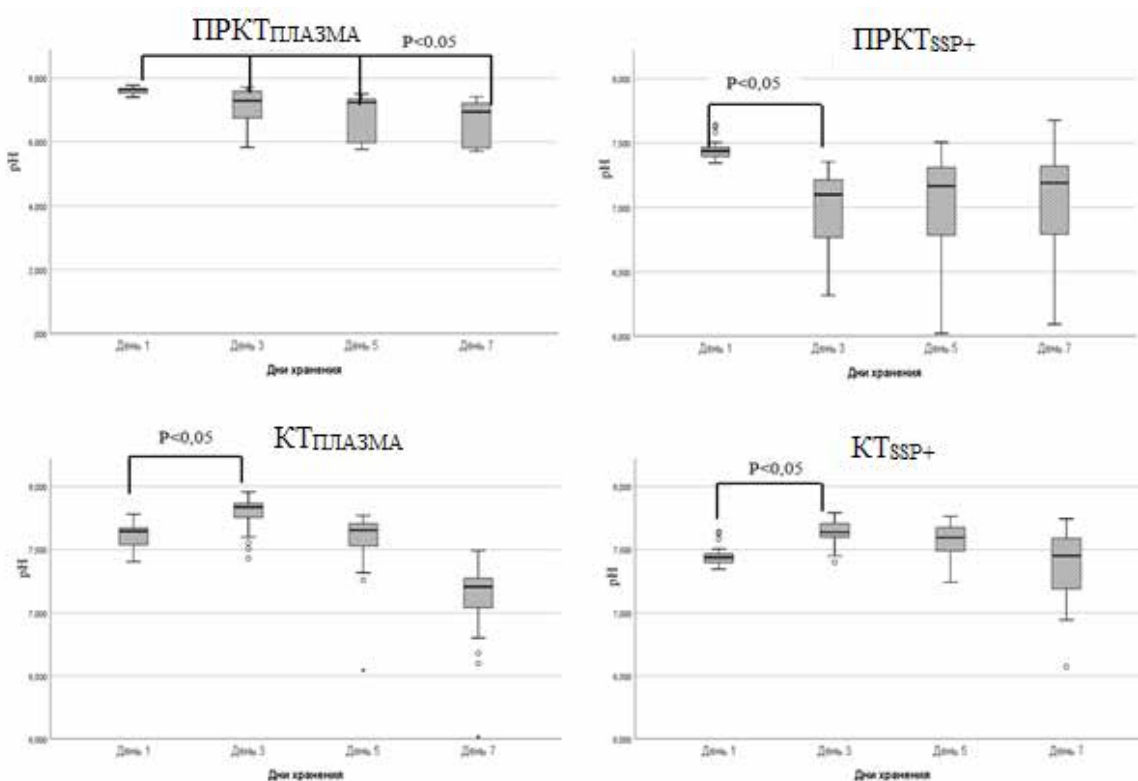


Рисунок 2. Изменение рН в средах КТ при хранении.

Это значение не изменялось в течение всего срока хранения в образцах ПРКТ_{SSP+}, но снижалось образцах ПРКТ_{ПЛАЗМА} ($p < 0,05$). При сравнении рН в КТ, подвергшихся и не подвергавшихся редукции патогенов, значительно ниже показатель рН

был в ПРКТ_{ПЛАЗМА}, чем в КТ_{ПЛАЗМА}, а также в ПРКТ_{SSP+} по сравнению с КТ_{SSP+} на протяжении всего срока хранения.

Метаболическую активность анаэробных процессов в КТ оценивали по скорости потребления глюкозы (табл. 1) и накоплению лактата (рис. 4) в среде суспендирования тромбоцитов. Общее потребление глюкозы и её потребление в отдельные сроки хранения в КТ_{ПЛАЗМА} и ПРКТ_{ПЛАЗМА} достоверно не менялось.

Таблица 1. Потребление глюкозы в КТ.

Тип КТ	Дни хранения КТ			
	1–3	3–5	5–7	1–7
КТ _{ПЛАЗМА} , ммоль/л	10,6 ± 15,1	17,52 ± 11,8	13,3 ± 10,6	41,4 ± 18,4**
ПРКТ _{ПЛАЗМА} , ммоль/л	12,8 ± 32,2	17,2 ± 31,4	8,9 ± 26,4	38,9 ± 27,3
КТ _{SSP+} , ммоль/л	2,5 ± 11,6*	9,8 ± 21,8*	11,6 ± 14,3	23,84 ± 21,2**
ПРКТ _{SSP+} , ммоль/л	26,8 ± 24,8 *	2,53 ± 31,7*	8,7 ± 24,1	35,2 ± 26,6

* - $p < 0,05$ между КТ_{SSP+} и ПРКТ_{SSP+}; ** - $p < 0,05$ между КТ_{SSP+} и КТ_{ПЛАЗМА}

В КТ_{SSP+} снижались общее потребление глюкозы с 1 по 7 день и её потребление в период с 1 по 3 и с 3 по 5 дни хранения. Редукция патогенов усиливала потребление глюкозы в первые 3 дня от изготовления ПРКТ_{SSP+}, в остальные дни хранения потребление не менялось. С увеличением времени хранения снижалась концентрация глюкозы во всех типах КТ (рис. 3). Исходно концентрация глюкозы была больше в КТ, суспендированных в плазме, чем в SSP+ в день заготовки: 100 (94 – 119) ммоль/л против 85 (75,5 - 92,5) ммоль/л ($p < 0,05$) (рис. 3).

Концентрация лактата увеличивалась по мере хранения во всех типах КТ. В образцах КТ_{SSP+} и ПРКТ_{SSP+} концентрация лактата в процессе хранения значимо не менялась (рис. 4). Более выраженное накопление лактата наблюдалось в КТ, суспендированных в плазме, чем в КТ, суспендированных в растворе SSP+.

Таким образом, за время хранения происходило потребление глюкозы и накопление лактата, снижение pH. Эти изменения, независимо от редукции патогенов, были более выражены в КТ, суспендированных в плазме, чем в SSP+.

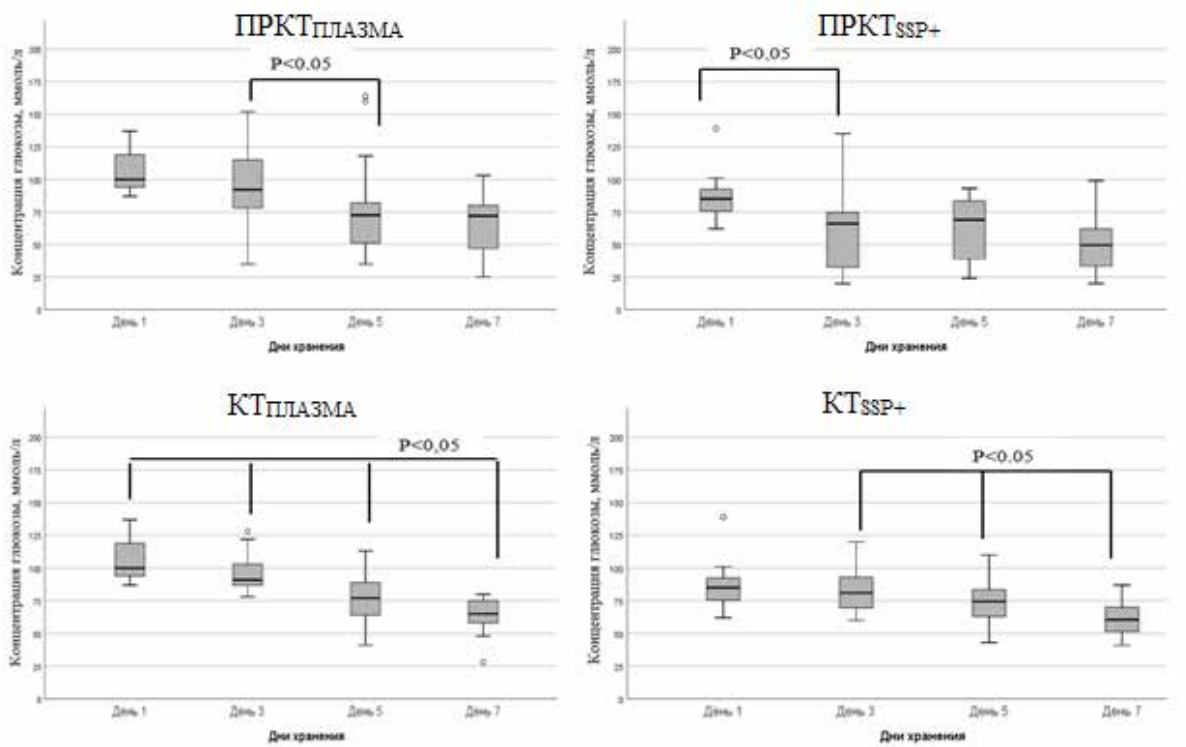


Рисунок 3. Концентрация глюкозы в КТ на различных сроках хранения.

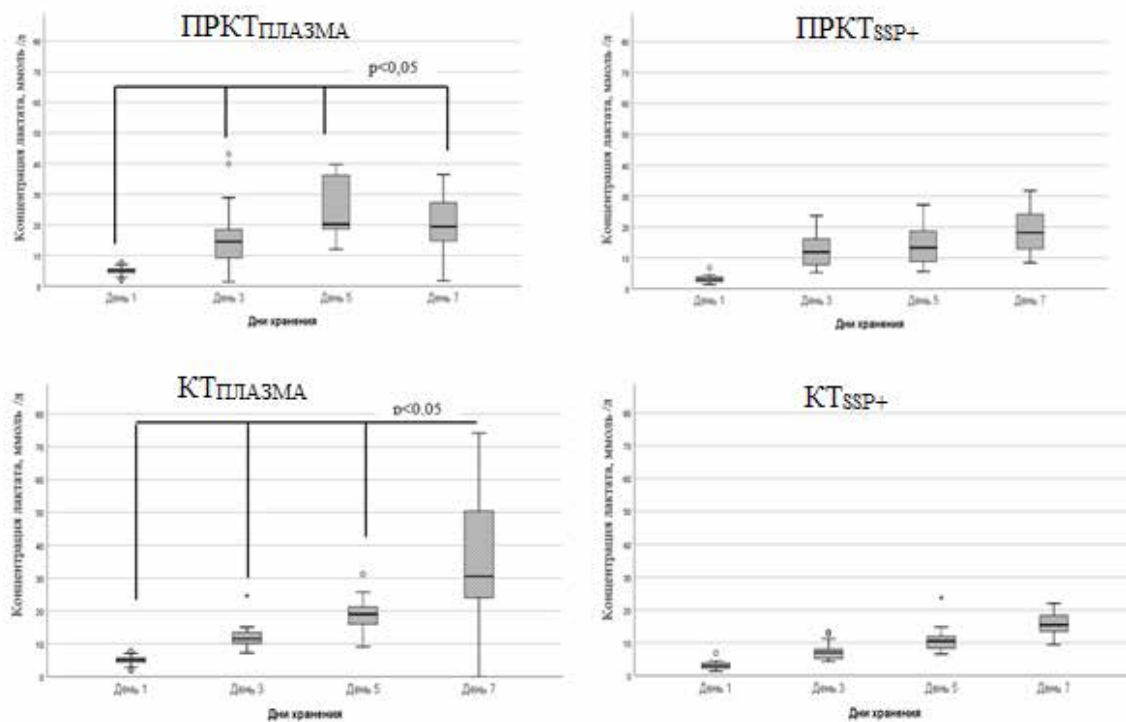


Рисунок 4. Концентрация лактата в КТ на различных сроках хранения.

Исследование маркеров активации тромбоцитов после инактивации патогенов

В день заготовки КТ_{ПЛАЗМА} доля спонтанно активированных тромбоцитов составила 16,9 (11,6–33,7) %. При хранении КТ, суспендированных в плазме, увеличивалась доля спонтанно активированных тромбоцитов, достигнув

максимального значения на 7 день 61,8 (2,3 - 69,4) % (табл. 2). В ПРКТ_{ПЛАЗМА} с первой точки исследования (3 день) и при хранении доля спонтанно активированных тромбоцитов увеличивалась, к 7 дню хранения достигала 66,6(54,4-77,8) %. В день заготовки КТ_{SSP+} доля спонтанно активированных тромбоцитов была 26,9 (21,6 - 36,9) % и при хранении увеличилась ($p<0,05$). В ПРКТ_{SSP+} увеличение доли спонтанно активированных тромбоцитов выявлено между 3 и 7 днями хранения ($p<0,05$) (табл. 2).

Таблица 2. Функциональная активность тромбоцитов при разных сроках хранения, Me (межквартильный интервал - МКИ).

КТ	Дни хранения			
	1	3	5	7
Доля спонтанно активированных тромбоцитов, %				
КТ _{ПЛАЗМА}	16,9 (12,3-3,5) [§]	40 (28,4-50,3) [§]	45,4(39,9-53,5) [§]	61,8 (52,3-69,4) [§]
КТ _{SSP+}	26,9 (21,6-36,9) ^{*§}	41,3 (35,4-54,7) [§]	57 (48-63,7) ^{*§}	67,4 (63,6-73,4) ^{*§}
ПРКТ _{ПЛАЗМА}	-	40,1 (26-72,4) [§]	58,2(40,1–85) [§]	66,6 (54,4-77,8) [§]
ПРКТ _{SSP+}	-	56(40,2-65,6) [§]	62,2(50,9-74,2)	68 (53-80,2) [§]
Доля АДФ-активированных тромбоцитов, %				
КТ _{ПЛАЗМА}	72,6 (52,4 - 83,6)	36,8 (22,4 - 48,5) [§]	23,6(16,2-36,6) [§]	7,9(2,4-18,1) [§]
КТ _{SSP+}	45,7 (24,1-75,1) [§]	23,4 (14,2 - 40,3) [§]	18 (12,4-28,8) [§]	16,3(10,4-22,9) ^{*§}
ПРКТ _{ПЛАЗМА}	-	32,3 (26,5-49,7) [§]	25,4 (10,7–36) [§]	1,9 (1,4-11,8) [§]
ПРКТ _{SSP+}	-	17,7 (11,6 - 31,5)	17 (12,8–30)	17,7(8,4-22,6) ^{**}

Примечания *различия между РОКТ_{ПЛАЗМА} и РОКТ_{SSP+} $p<0,05$, ** различия между ПРКТ_{ПЛАЗМА} и ПРКТ_{SSP+} $p<0,05$, § - изменения значимы по отношению к предыдущему дню.

В КТ_{ПЛАЗМА} по мере хранения уменьшалась доля тромбоцитов, способных отвечать на стимуляцию АДФ через 3, 5 и 7 дней ($p<0,05$). В ПРКТ_{ПЛАЗМА} доля тромбоцитов, отвечающих на стимуляцию АДФ, с 3 по 7 дни хранения также снижалась (табл. 2). Доля АДФ-стимулированных тромбоцитов уменьшалась на протяжении 7 дней хранения КТ_{SSP+} ($p<0,05$). При хранении доля АДФ-стимулированных АДФ в ПРКТ_{SSP+} значимо не менялась. При оценке влияния среды заготовки на 7 день хранения доля АДФ-стимулированных тромбоцитов была выше в

КТ, суспендированных в SSP+, по сравнению с КТ, суспендированными в плазме (табл. 2). Не выявлено значимых различий между долями спонтанно активированных тромбоцитов и АДФ-активированных тромбоцитов между патогенредуцированными КТ и КТ без редукции патогенов при хранении. Таким образом, по мере хранения ухудшались функциональные показатели КТ вне зависимости от среды суспендирования и редукции патогенов. По мере хранения доля спонтанно активированных тромбоцитов увеличивалась во всех КТ, а доля АДФ-активированных тромбоцитов снижалась, за исключением ПРКТ_{SSP+}. Использование SSP+ обеспечивало большую резидуальную активность тромбоцитов при хранении.

Исследование клинической эффективности трансфузий КТ

Выполнено 356 трансфузий, перелито 3095 единиц (932,5 дозы) КТ. Каждому пациенту переливали от 8,3 до 91,3 единиц, в среднем 16,6 единиц (4,98 доз) КТ. Провели 104 трансфузии РОКТ_{ПЛАЗМА}, 195 - ПРКТ_{ПЛАЗМА}, 33 - РОКТ_{SSP+} и 24 - ПРКТ_{SSP+}. Трансфузии ПРКТ_{ПЛАЗМА}, ПРКТ_{SSP+}, РОКТ_{ПЛАЗМА}, РОКТ_{SSP+} соответствовали критериям эффективности по АПТ1 и АПТ24, СПТ1 и СПТ24.

Эффективности трансфузий КТ различных типов в зависимости от сроков хранения и синдрома повышенного потребления тромбоцитов

Из 356 трансфузий 173 (48,5%) выполнены с целью лечения геморрагического синдрома и 183 (51,4%) – для его профилактики. Признаками ППТ у реципиентов были: повышение температуры тела $>38^{\circ}\text{C}$, сепсис, пневмония. Доля профилактических трансфузий КТ больных с ППТ составила 23,3% (45 из 183) от всех профилактических трансфузий. Доля терапевтических трансфузий КТ больным с синдромом ППТ составила 18% (32 из 173) от всех терапевтических трансфузий. Проанализирована эффективность трансфузий ПРКТ_{ПЛАЗМА}; РОКТ_{ПЛАЗМА}; ПРКТ_{SSP+}; РОКТ_{SSP+} с разными сроками хранения по параметрам СПТ1 и СПТ24 с учетом ППТ. Наблюдалось снижение эффективности трансфузий КТ при хранении >3 дней (рис. 5).

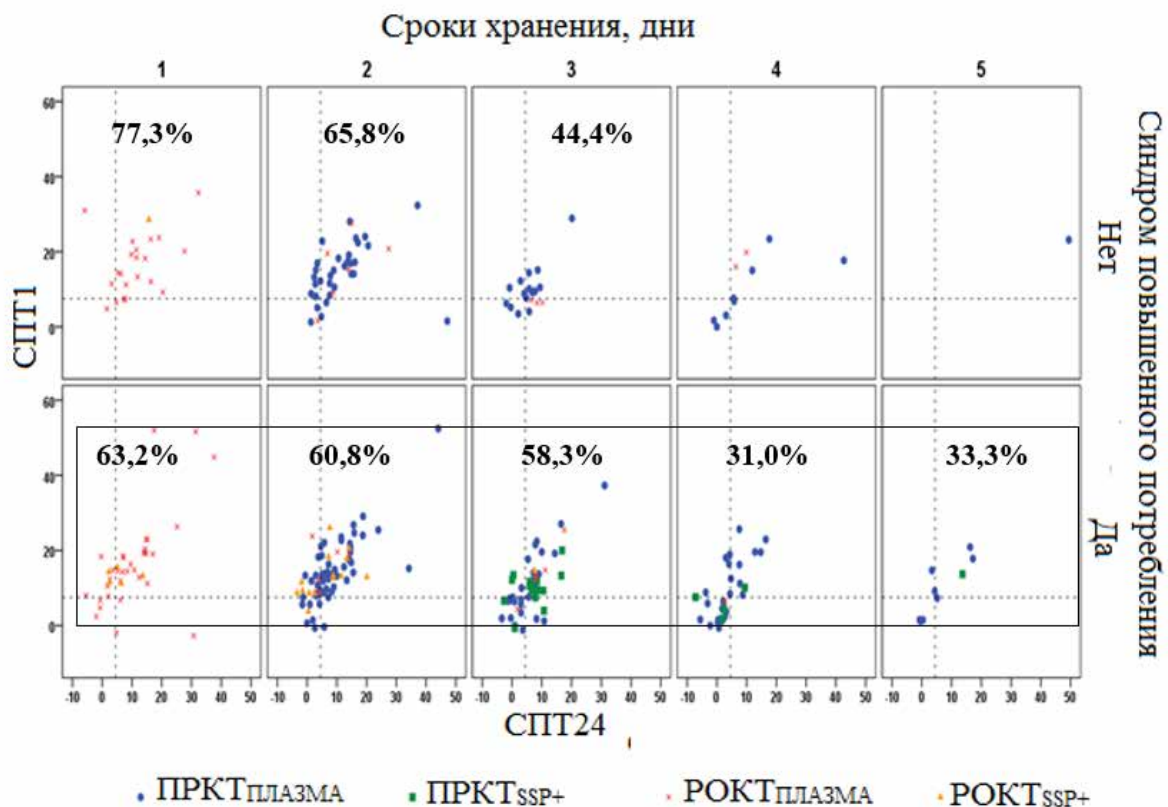


Рисунок 5. Доля эффективных трансфузий КТ, с учетом ППТ и сроков хранения КТ.

Доля эффективных трансфузий резко снижалась после 3 дней хранения, поэтому дальнейшую сравнительную оценку эффективности трансфузий проводили для трансфузий КТ со сроком хранения, ≤ 3 дней и >3 дней с учетом синдрома ППТ (рис. 6). Значимого влияния метода обработки и среды суспендирования КТ на эффективность трансфузий по параметрам СПТ1 и СПТ24 не выявлено вне зависимости от наличия или отсутствия синдрома ППТ у больного (рис. 6).

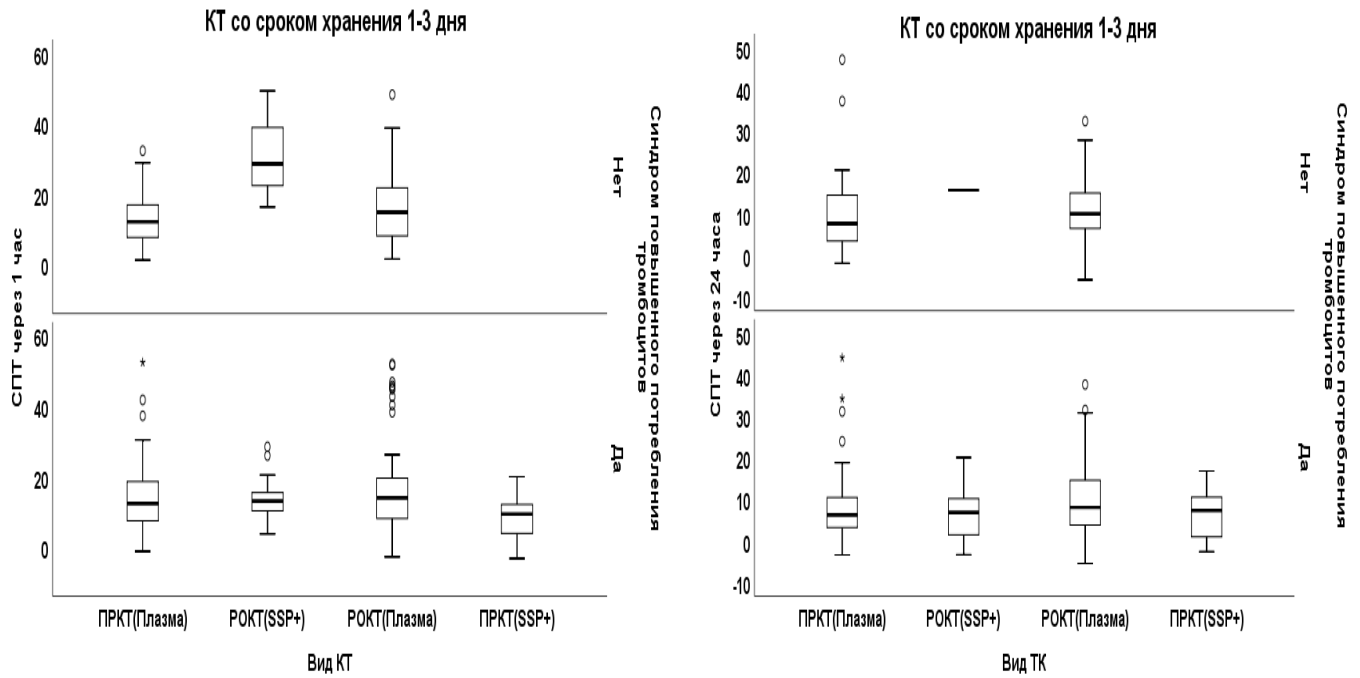


Рисунок 6. Эффективность трансфузий по СПТ1 и СПТ24 в зависимости от типа КТ, со сроком хранения ≤ 3 дней и >3 дней, с учетом синдрома ППТ.

Поскольку не выявлено влияния метода обработки и среды суспендирования на эффективность трансфузий КТ, дальнейшая оценка проводилась без учета типа КТ, со сроком хранения, ≤ 3 дней и >3 дней, с учетом наличия ППТ. Время хранения >3 дней уменьшало эффективность СПТ1 и СПТ24: при наличии ППТ с 56,4% на сроке до 3 дней, до 31,6% - после 3 дней ($p=0.007$). Частота эффективных трансфузии КТ со сроком хранения ≤ 3 дней и >3 дней у больных без ППТ была одинакова (60,2% и 63,6%, $p=0,65$) (рис. 7). Следовательно, у больных с ППТ вне зависимости от метода обработки, способа заготовки применение КТ со сроком хранения >3 дней обеспечивает эффективность трансфузии менее, чем в половине случаев.

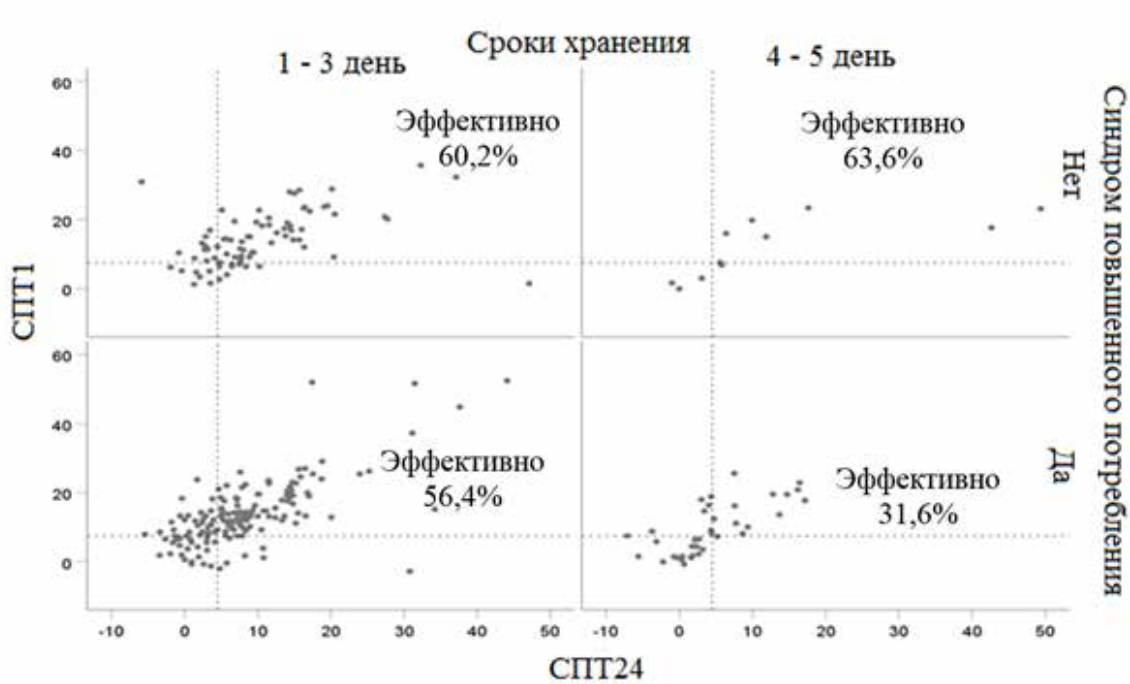
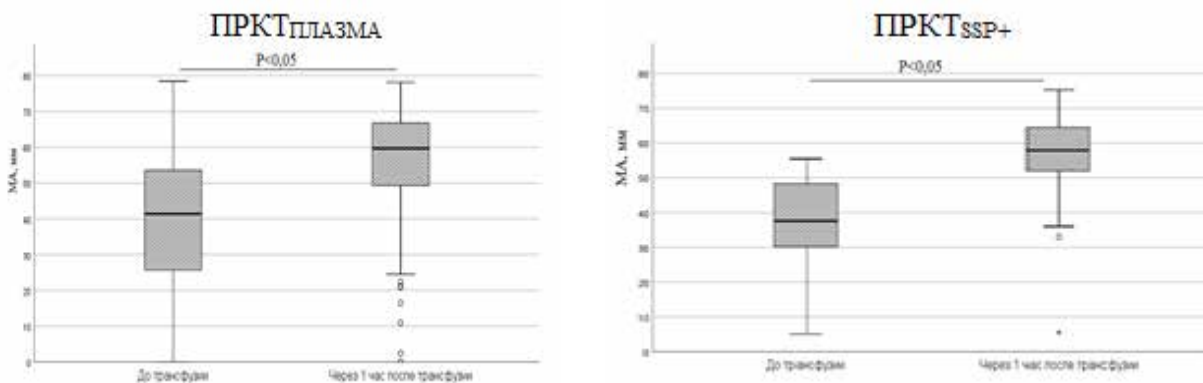


Рисунок 7. Влияние времени хранения КТ (≤ 3 дней и > 3 дней) на эффективность трансфузии при наличии синдрома ППТ и без синдрома ППТ у реципиента.

Изменение МА в тесте «Функциональный фибриноген» после трансфузии различных типов КТ

Основным параметром эффективности трансфузий по ТЭГ считали МА. Этот показатель через 1 час после трансфузии был значимо выше, чем до трансфузии всех типов КТ (ПРКТ_{ПЛАЗМА}, РОКТ_{ПЛАЗМА}, ПРКТ_{SSP+}, РОКТ_{SSP+}) (рис. 8).

Трансфузии КТ, суспендированных как в плазме, так и в добавочном растворе SSP+, значимо не влияли на величину МА_{FF} в тесте «Функциональный фибриноген»: РОКТ_{ПЛАЗМА} – 23 (13,3 – 29) мм против 24 (16,4 – 33,6) мм (рис. 20, а); РОКТ_{SSP+} – 26,5 (18 – 42,4) мм против 27 (17,5 – 38) мм (рис. 9, а, б).



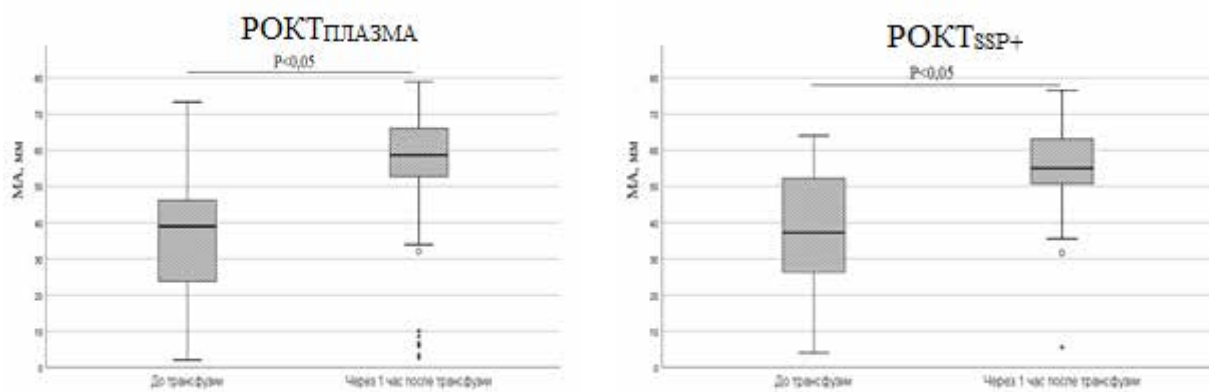


Рисунок 8. Изменения МА до и через 1 ч после трансфузии различных типов КТ.

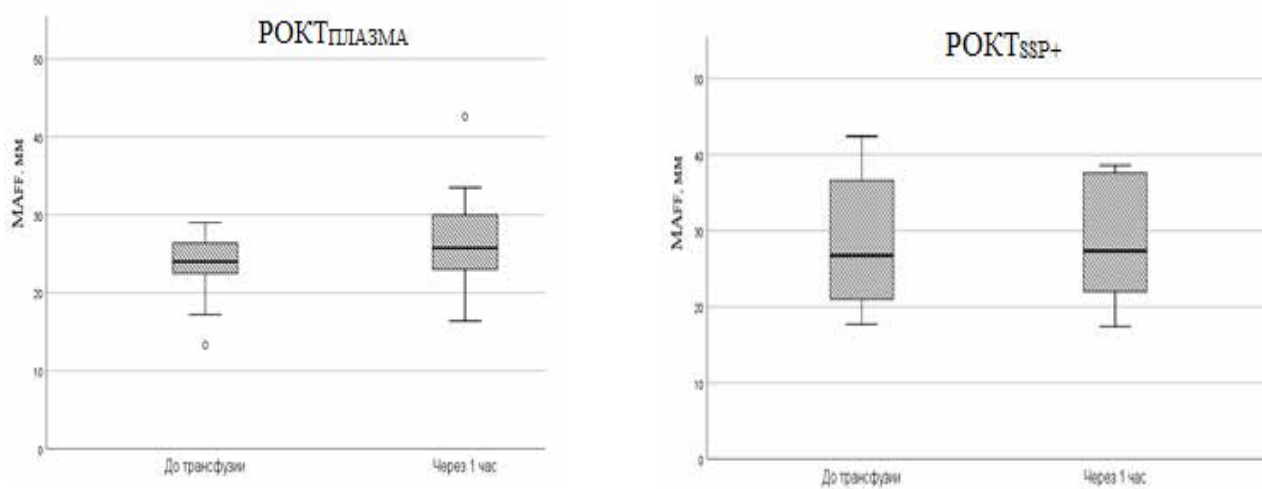


Рисунок 9. Результаты теста «Функциональный фибриноген»

Метод обработки и среда суспендирования не снижали эффективность трансфузий КТ по параметру МА вне зависимости от ППТ (рис. 10).

У больных с ППТ эффективные трансфузии по показателям СПТ1 и МА1 были отмечены в 70% случаев, неэффективные в 11%, соответствовали критериям эффективности только по величине МА1 – 14%, только по СПТ1- 5%. Таким образом, редукция патогенов и среда суспендирования не влияли на эффективность трансфузий КТ, оцененной по СПТ1 и СПТ24. На эффективность трансфузий влияли время хранения КТ и ППТ. Снижение эффективности отмечено после переливания КТ со сроком хранения >3 дней пациентам с ППТ. ТЭГ может использоваться для оценки эффективности трансфузий тромбоцитов. В 14-20% случаев даже при недостаточном количественном приросте тромбоцитов при достижении целевых значений МА на ТЭГ ≥ 44 мм отмечался гемостатический эффект.

Заключение

В работе изучены качество и эффективность трансфузий КТ, суспендированных в плазме или смеси плазмы и раствора SSP+, после проведения редукции патогенов или рентгеновского облучения. Редукция патогенов не оказывала отрицательного влияния на метаболизм и функциональную активность тромбоцитов, но препятствовала спонтанной активации тромбоцитов. Изменения биохимических параметров зависели от среды суспендирования КТ и времени хранения. За время хранения КТ в нем потреблялась глюкоза и накапливался лактат, что приводило к уменьшению pH. Эти изменения были более выражены в КТ, заготовленных в плазме. С увеличением времени хранения доля спонтанно активированных тромбоцитов увеличивалась во всех типах КТ, а доля АДФ-активированных тромбоцитов снижалась, за исключением ПРКТ_{ssp+}. Использование раствора SSP+ обеспечивало более высокую резидуальную активность тромбоцитов при хранении. Отсутствовала зависимость эффективности трансфузий, оцененной по СПТ, МА, прекращению геморрагического синдрома и ИМТ, от методов обработки и среды суспендирования КТ. Эффективность трансфузий ПРКТ_{ПЛАЗМА}, РОКТ_{ПЛАЗМА}, ПРКТ_{SSP+} и РОКТ_{SSP+} зависела от сроков хранения КТ и наличия ППТ. Существенное снижение эффективности трансфузий отмечено после переливания КТ со сроком хранения >3 дней пациентам с ППТ (31,6% случаев, $p=0.007$). ТЭГ может использоваться для оценки эффективности трансфузий КТ. В 14-20% случаев при недостаточном

количественном приросте тромбоцитов, но достижении $MA \geq 44$ мм отмечался гемостатический эффект.

Выводы

1. Инактивация патогенов в концентратах тромбоцитов амотосаленом в сочетании с ультрафиолетовым облучением спектром А не оказывала негативного влияния на рН, потребление глюкозы, накопление лактата, концентрацию цитрата в процессе хранения как суспендированных в плазме, так и в смеси раствора SSP+ и плазмы. Среда суспендирования влияла на процесс гликолиза, который был более выражен в концентратах тромбоцитов, суспендированных в плазме, чем в смеси плазмы и раствора SSP+.
2. Спонтанная активация тромбоцитов, определяемая по экспрессии Р-селектина, увеличивалась с увеличением срока хранения во всех типах концентратов тромбоцитов. В необработанных концентратах тромбоцитов, суспендированных в плазме, экспрессия Р-селектина была ниже, чем в суспендированных в смеси плазмы и раствора SSP+. Редукция патогенов не влияла на спонтанную активацию тромбоцитов, суспендированных как в плазме, так и в смеси плазмы и раствора SSP+. Редукция патогенов и суспендирование тромбоцитов в смеси раствора SSP+ и плазмы позволили на протяжении всего срока хранения сохранить резидуальную активность тромбоцитов, оцененную по экспрессии PAC-1/CD62p под действием АДФ. В остальных типах концентратов тромбоцитов их резидуальная активность снижалась по мере хранения.
3. Частота эффективных трансфузий концентратов тромбоцитов, оцененная по скорректированному приросту тромбоцитов через 1 ч и 24 ч, составила 58-77,3% и не различалась в зависимости от метода обработки и среды суспендирования.
4. Тромбоэластография может использоваться для оценки эффективности трансфузий тромбоцитов. В 14–20% случаев при недостаточном количественном приросте тромбоцитов при увеличении максимальной амплитуды тромбоэластограммы ≥ 44 мм отмечался гемостатический эффект.
5. На эффективность трансфузий концентратов тромбоцитов влияли время их хранения и синдром повышенного потребления тромбоцитов. У больных с повышенным потреблением тромбоцитов при переливании концентратов тромбоцитов со сроком хранения ≤ 3 дней эффективность трансфузий регистрировали в 56,4% случаев, а со сроком хранения > 3 дней – в 31,6% случаев ($p=0.007$).

Практические рекомендации

1. Для повышения безопасности КТ и уменьшения трансфузионной нагрузки на одного реципиента, необходимо заготавливать КТ методом афереза, а в качестве среды суспендирования КТ рекомендуется применение добавочных растворов, которые замещают большую часть донорской плазмы. Применение добавочного раствора повышает иммунологическую безопасность этого компонента крови, делает более стабильным, предотвращает спонтанную активацию тромбоцитов при хранении.
2. Целесообразно обрабатывать КТ, суспендированные как в плазме, так и в смеси плазмы и добавочного раствора амотосаленом и УФА, что сводит к минимуму риск заражения реципиентов гемотрансмиссивными инфекциями и позволяет отказаться от гамма-облучения или рентген-облучения.
3. Для оценки интенсивности геморрагического синдрома рекомендуется использование шкалы кровотечений по ВОЗ.

Количественно эффективность трансфузий КТ отражает абсолютный прирост тромбоцитов (АПТ) и скорректированный прирост тромбоцитов (СПТ). АПТ определяется по разнице содержания тромбоцитов в крови у реципиента до и после трансфузии. Эффективной считается трансфузия, при которой $АПТ \geq 10 \times 10^9 / л$, $СПТ1 \geq 7,5 PE$, $СПТ24 \geq 4,5 PE$. СПТ рассчитывается по формуле:

$$СПТ (PE) = \frac{АПТ \times S}{\text{Количество перелитых тромбоцитов}}, \text{ где}$$

8. Оценка эффективности трансфузий КТ целесообразно проводить с помощью ТЭГ, поскольку даже при малом количественном приросте тромбоцитов крови после трансфузии КТ при достижении МА ≥ 44 мм отмечался гемостатический эффект.
9. Для достижения максимальной эффективности больным с синдромом повышенного потребления тромбоцитов рекомендуется переливать КТ со сроком хранения ≤ 3 дней. КТ с большим сроком хранения, эффективны в меньшем количестве случаев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Азимова М.Х., Галстян Г.М., Гапонова Т.В., Карякин А.В., Крюкова Г.Н., Нехаевская С.С., Скоцеляс Е.Д., Флегонтов П.А. Биохимические параметры концентратов донорских тромбоцитов при хранении после проведения инактивации патогенов с помощью технологии амотосален + ультрафиолетовое облучение спектра А *in vitro*. // Гематология и трансфузиология. – 2017. - Т. 62 - № 1. – С. 37–40.
2. Азимова М.Х., Гапонова Т.В., Галстян Г.М., Гальцева И.В., Давыдова Ю.О., Капранов Н.М., Савченко В.Г. Изменения маркеров активации донорских тромбоцитов при хранении после проведения инактивации патогенов с помощью технологии амотосален +

ультрафиолетовое облучение спектра А. // Гематология и трансфузиология. - 2017. – Т. 62 - №4. – С. 197–203.

3. Азимова М.Х., Галстян Г.М., Гапонова Т.В., Дроков М.Ю., Дубинкин И.В., Журавлев В.В. Сравнительная оценка клинической эффективности и безопасности трансфузий концентратов тромбоцитов, подвергнутых инаktivации патогенов. // Гематология и трансфузиология. – 2018. – Т. 63 - №1 (прил.1). - С.13.

4. Азимова М.Х., Галстян Г.М., Гапонова Т.В. Клиническое использование компонентов донорской крови у пациентов с заболеваниями крови. В кн. под ред. В.Г. Савченко. Алгоритмы диагностики и протоколы лечения заболеваний системы крови. М: 2018. С. 975-988.

5. Азимова М.Х., Журавлев В.В., Атрощенко Г.В., Головкина Л.Л. Диагностика и терапия иммунологической рефрактерности у реципиентов концентратов тромбоцитов. // Гематология и трансфузиология. - 2014. - Т. 59. - № S1. - С. 77

6. Azimova M.H., Drovov M.Y., Troitckaya V.V., Kuzmina A.V., Bulgakov A.V., Gaponova T.V. Analysis of donor platelet concentrate transfusions efficiency with shelf life from 1 to 5 days, treated with intercept blood system platelet and gamma-irradiated platelets //Vox Sang. – 2016. - № 111 (Suppl. 1) – P. 159 – 160.

7. Azimova M.H., Karyakin A.V., Skotselyas E.D., Kryukova G.N., Nechaevskaya S.S., Davydova Y.O., Kapranov N.M., Galtseva I.V., Drovov M.Y., Gaponova T.V. Pathogen reduction of platelets by intercept blood system: in vitro functional and survival parameters // Vox Sang. – 2016. - № 111 (Suppl. 1). – P. 161 – 162.

8. Gaponova T., Azimova M., Rahmani A., Zhiburt E. Clinical safety of amotosalen/UVA pathogeninactivated apheresis platelet components in routine use. //Vox Sang. – 2016. - №111 (Suppl. 1). – P. 272 – 273.

9. Azimova M., Galstyan G., Troitskaya V., Bulgakhov A., Drovov M., Polevodova O., Gaponova T. Comparison of the efficacy of γ -irradiated platelet concentrates suspended in 100% plasma or 30% plasma and 70% platelet additive solution (PAS) //Vox Sangs. – 2017. -Т.112-S1.-P. 256-257.

10. Azimova M., Galstyan G., Gaponova T., Karyakin A., Kryukova G., Nekhaevskaya S., Skotselyas E., Flegontov P. Comparison of amotosalen/UVA light pathogenreduced platelets in 100% plasma vs amotosalen/UVA light pathogen-reduced platelets in PAS: in vitro functional and survival parameters. // Vox Sang. - 2017. - Т. 112 - № S1. - P. 263 - 264.

11. Azimova M.Kh., Galstyan G.M., Gaponova T.V., Drovov M.Yu., Dubinkin I.V., Zhuravlev V.V., Mikhailova E.A. Comparison of clinical efficacy and safety of the pathogen reduced and gamma–irradiated platelet concentrates. //Transfusion. - 2017. - Т. 57 - S3 - P. 169A.