

Сравнение морфофункциональных свойств тромбоцитов в зависимости от различных способов процессинга

О.В. Карпова¹, И.В. Образцов¹, П.Е. Трахтман¹, А.А. Игнатова¹, М.А. Пантелеев^{1,4,5}, С.А. Румянцев¹⁻³

¹ФГБУ ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва;

117198, Россия, Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1;

³ФГАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», Долгопрудный; 141700, Россия, Московская область, Долгопрудный, Институтский переулок, 9;

⁴ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва; 119991, Россия, Москва, ул. Косыгина, 4;

⁵ГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1

Контакты: Оксана Викторовна Карпова ovk_67@mail.ru

На сегодняшний день предложены различные технологии заготовки и обработки концентратов тромбоцитов (КТ), направленные на достижение максимальной эффективности трансфузий и минимизацию рисков посттрансфузионных реакций. Однако данные по влиянию различных подходов к процессингу КТ на морфофункциональные характеристики тромбоцитов и, как следствие, на клиническую эффективность трансфузий неоднозначны.

В работе проанализировано влияние применения добавочного раствора при заготовке и использования методов инактивации патогенов (рентгеновское облучение, облучение ультрафиолетом после фотосенсибилизации рибофлавином) на морфологические и функциональные параметры тромбоцитов в КТ.

Полученные данные позволяют оптимизировать технологию заготовки и обработки КТ для достижения большей эффективности трансфузионной терапии.

Ключевые слова: концентрат тромбоцитов, добавочный раствор, плазма, инактивация патогенов, рибофлавин, ультрафиолет

Comparison of platelets characteristics according to various processing methods

O.V. Karpova¹, I.V. Obratsov¹, P.E. Trakhtman¹, A.A. Ignatova¹, M.A. Panteleev^{1,4,5}, S.A. Rumyantsev¹⁻³

¹Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitriy Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow; 1, Samory Mashela st., Moscow, Russia, 117198;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow; 1, Ostrovityanova st., Moscow, Russia, 117997;

³Moscow Institute of Physics and Technology State University; 9, Institutskiy per., Dolgoprudnyi, Moscow Oblast, Russia, 141700;

⁴Theoretical Problems Center of Physical and Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow; 4, Kosygina st., Moscow, Russia, 119991;

⁵M.V. Lomonosov Moscow State University; 1, Leninskie gory, Moscow, Russia, 119991

To date different techniques of platelet concentrates (PC) preparation and processing are proposed to achieve the best efficiency of transfusions and to minimize the risks post-transfusion reactions. However, data on the impact of different approaches to PC preparation and processing on morphological and functional characteristics of platelets and, as a consequence, the clinical efficacy of transfusions is controversial.

In this paper we analyzed the impact of the platelet storage solution and different methods of pathogen inactivation (X-rays, UV-irradiation after photosensitization with riboflavin) on morphological and functional parameters of platelets.

Our findings allow optimizing the technology of preparation and processing of PC to achieve greater effectiveness of transfusion therapy.

Key words: platelet concentrate, platelet storage solution, plasma, pathogen inactivation, riboflavin, ultraviolet

Введение

Постоянной задачей клинической трансфузиологии является оптимизация и совершенствование технологии заготовки и обработки компонентов крови для обеспечения максимально качественной гемотрансфузионной поддержки [1, 4] и минимизации риска посттрансфузионных реакций.

Процессинг аферезных концентратов тромбоцитов (АКТ) с пониженным содержанием плазмы можно

рассматривать как один из способов заготовки компонентов крови с целью уменьшения частоты трансфузионных реакций, связанных с биоактивными компонентами плазмы.

В последнее десятилетие на фоне роста числа заместительных трансфузий [2, 12, 14, 28] все больший интерес представляет заготовка концентратов тромбоцитов (КТ) с применением добавочных растворов (ДР) с целью снижения вероятности развития негемолити-

ческих посттрансфузионных реакций. Кроме того, использование ДР при заготовке КТ способствует сохранению функциональной активности тромбоцитов при длительных сроках хранения [20, 22, 27].

Для максимального уменьшения инфекционных рисков целесообразно внедрение различных технологий инактивации патогенов (ИП) и донорских лейкоцитов в клеточных компонентах крови (синонимы: инактивация патогенов, вирусиактивация). Современные технологии ИП позволяют в короткие сроки получать КТ, свободные от патогенов (вирусов, бактерий, простейших), тем самым обезопасив реципиента от возможных трансфузионных осложнений. В отличие от бактериальной детекции, эффективные технологии ИП могут значительно снизить риск пролиферации минимального уровня бактерий при хранении [7, 8, 13, 23, 25].

Процедура заготовки, процессинга и хранения тромбоцитов приводит к выраженным изменениям их морфологических и функциональных характеристик, что в свою очередь ведет к снижению терапевтической эффективности трансфузионной терапии [16, 26]. Это явление известно как «повреждение тромбоцитов при хранении» (platelets storage lesion, PSL) [26].

Применяемые различные способы заготовки и методы обработки компонентов крови должны обеспечивать максимальное сохранение функциональной активности и жизнеспособности выделенных клеток крови при гемотрансфузиях [6]. Необходимо всесторонне оценить не только морфофункциональные характеристики клеток, но и клиническую эффективность КТ, заготовленных и обработанных разными методами.

По морфологическим параметрам тромбоцитов можно проанализировать их биологическую полноценность — структурную целостность и функциональную активность тромбоцитов. Адекватный гемостатический эффект при клиническом использовании КТ зависит от оценки параметров биологической полноценности клеток [5]. В работе проанализирована динамика показателей КТ (PLT), содержания больших тромбоцитов (P-LCR) и степени анизоцитоза (PDW) в процессе хранения КТ. PLT является важным показателем качества хранящихся тромбоцитов; показатель P-LCR отражает содержание клеток, характеризующихся высокой активностью в процессах тромбообразования; величина PDW определяет степень анизоцитоза и указывает на наличие агрегатов тромбоцитов или их фрагментов.

Маркеры активации тромбоцитов являются важными показателями их жизнеспособности и функциональной активности. Функциональное состояние переливаемых тромбоцитов имеет первоочередное значение для купирования геморрагического синдрома (остановки кровотечения). На посттрансфузионную активность тромбоцитов оказывает влияние любое воздействие на клетку в процессе заготовки, обработки и хранения КТ, что может приводить к не-

желательной активации и высвобождению содержимого гранул. Поэтому *in vitro* исследование активации в КТ поможет прогнозировать его посттрансфузионные свойства. Одним из распространенных показателей активации является Р-селектин. Доказана обратная корреляция экспрессии Р-селектина с величиной посттрансфузионного восстановления тромбоцитов через 15–60 мин после трансфузии и величиной скорректированного прироста тромбоцитов через 1 ч после переливания [24]. Важным прогностическим признаком функциональной активности и жизнеспособности тромбоцитов после трансфузии является определение связывания аннексина V с фосфатидилсерином (ФС) [9]. ФС представляет собой фосфолипид внутреннего слоя клеточной мембраны; появление ФС во внешнем слое свидетельствует об активации тромбоцита или запуске в нем процесса апоптоза [15].

Некоторые исследователи [21] считают, что ни один из маркеров активации тромбоцитов не оказался эффективным предиктором восстановления или выживаемости тромбоцитов после переливания. Таким образом, этот вопрос остается на сегодняшний день открытым.

В предлагаемом исследовании выполнена оценка качества КТ, заготовленных с применением ДР SSP+ (Макофарма, Франция) и обработанных по технологии патогенной редукции Mirasol (CaridianBCT) на основании морфофункциональных характеристик тромбоцитов.

Материалы и методы

КТ были получены стандартизированно от здоровых доноров, прошедших рутинное обследование и выразивших согласие на проведение процедуры автоматического афереза. Численность обследуемых контингентов представлена в табл. 1.

АКТ были получены на сепараторе клеток TrimaAccel (CaridianBCT, США). Заготовка КТ была проведена двумя способами: классическим — в 100 % плазме и с ДР.

Таблица 1. Численность обследуемых совокупностей

		Морфология	Цитометрия
КТ-плазма	КТ-К	41	12
	КТ-Rg	41	12
	КТ-М	12	12
КТ-ДР	КТ-К	38	10
	КТ-Rg	38	10
	КТ-М	10	10

Примечание (здесь и в табл. 2): КТ-К — контрольная группа (без ИП); КТ-Rg — ИП рентгеновским излучением; КТ-М — ИП ультрафиолетом после фотосенсибилизации рибофлавином (Mirasol PRT).

Таблица 2. Схема разделения АКТ, заготовленных разными способами, для последующей обработки разными методами

КТ-плазма (n = 12)			КТ-ДР (n = 10)		
Объем – 570 мл			Объем – 610 мл		
Количество тромбоцитов $8,5 \times 10^{11}$			Количество тромбоцитов $8,5 \times 10^{11}$		
КТ-К	КТ-Rg	КТ-М	КТ-К	КТ-Rg	КТ-М
105 мл	80 мл	360 мл	105 мл	80 мл	450 мл
$1,55 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$	$5,4 \times 10^{11}$	$1,55 \times 10^{11}$	$1,1 \times 10^{11}$	$6,3 \times 10^{11}$

Установленный объем ДР добавляли сразу по окончании процедуры афереза в расчете на такой конечный объем КТ, чтобы выполнялось условие не менее 40 мл на $0,6 \times 10^9$ клеток. При этом соотношение донорской плазмы и ДР составляет 1:3 (30 % плазмы и 70 % ДР). Плазмозамещающий раствор добавляли к гиперконцентрированному АКТ с использованием устройства для стерильного запаивания трубок пластиковых гемоконтейнеров TSCD-II (Terumo, США).

При исследовании образцов КТ, обработанных разными методами, разделение исходного КТ проводили по схеме, как указано в табл. 2.

Все заготовленные КТ были лейкоредуцированы с помощью встроенной в камеры лейкоредукции LRS, с обязательным последующим лабораторным контролем. Все КТ, участвовавшие в исследовании, содержали лейкоциты менее 1×10^6 .

Вирусинактивация КТ проводилась по технологии Mirasol PRT (CaridianBCT, США) – фотохимическая ИП и аллогенных лейкоцитов в КТ и плазме, основанная на сочетанном использовании рибофлавина и ультрафиолетового облучения. Вирусинактивация КТ проводилась строго согласно инструкции производителя.

Rg-облучение КТ проводили в день заготовки не позднее 2 ч после заготовки на рентгеновском аппарате АРДОК-1, производитель ООО ВЭЛИТ НПП (Россия).

КТ хранились в интегрированных полимерных контейнерах производства компании CaridianBCT в течение 5 дней со дня заготовки при температуре $+20-24^\circ\text{C}$ в термостате при постоянном помешивании.

В АКТ обеих групп общее количество тромбоцитов на 1 гемоконтейнер при хранении не превышало $5,1 \times 10^{11}$.

Образцы проб из КТ забирали в стерильных условиях с использованием устройства для стерильного запаивания трубок пластиковых гемоконтейнеров TSCD-II (Terumo, США). Отбор проб КТ проводили через 2 ч после афереза: 1 ч – фаза покоя, КТ находился вне шейкера, комнатная температура хранения (для спонтанной дезагрегации); 1 ч – в термостате при температуре $+20-24^\circ\text{C}$ при постоянном

перемешивании. Для отбора проб удаляли по 3 мл образца в каждый день исследования (0, 1, 3 и 5-й дни).

Подсчет количества тромбоцитов и исследование проводили на автоматическом гематологическом анализаторе Sysmex KX-21 путем разведения образца буферным раствором в соотношении 1:10 после предварительного перемешивания образца на программируемом ротаторе-миксере BioSan MultiBio RS-24 (BioSan, Латвия). Исследовали следующие морфологические параметры: среднее количество, индекс содержания больших тромбоцитов, объем которых превышает 12 фл (P-LCR), средний объем (MPV) и ширина распределения по объему (PDW). Измерение указанных параметров проводили сразу после заготовки (TK0), на 1-й день после заготовки (TK1), на 3-й (TK3) и 5-й (TK5) дни хранения.

Функциональную активность тромбоцитов определяли методом проточной цитометрии. Образцы КТ разбавляли в 40 раз буфером А (150 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 0,4 мМ NaH_2PO_4 , 20 мМ HEPES, 5 мМ глюкозы, 0,5 % бычий сывороточный альбумин, pH 7,4) с добавлением 5 мМ CaCl_2 . В качестве маркеров активации тромбоцитов измеряли экспрессию Р-селектина и ФС на поверхности тромбоцитов методом проточной цитометрии на AccuriC6 (BD Biosciences, USA) с помощью флуоресцентно меченых антител PE-CD62P (eBioscience, USA), FITC-PAC-1 (BD Biosciences, USA) и Alexa 647-annexinV (Biolegend, USA). Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения CFlowPlus.

Для активации тромбоцитов в пробы вносили аналог коллагена CRP (collagen related peptide) до конечной концентрации 20 мкг/мл и перемешивали. Активацию проводили в течение 15 мин, после чего в пробы добавляли флуоресцентно меченые антитела и инкубировали еще 5 мин. Затем пробы разбавляли в 20 раз буфером А с 2,5 мМ CaCl_2 и анализировали на проточном цитометре.

Статистический анализ результатов проводили с помощью программного пакета Origin 8.0 (OriginLab-Corp., USA) и программного пакета MedCalc 12.5 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Результаты и обсуждение

Характеристика КТ, заготовленных в плазме: средний объем КТ — 444 ± 102 мл, средняя концентрация тромбоцитов составила $6,6 \pm 1,5 \times 10^{11}$.

Характеристика КТ, заготовленных с раствором ДР: средний объем КТ до добавления ДР составил $131 \pm 25,8$; после добавления — 437 ± 86 мл. Средняя концентрация тромбоцитов составила $6,5 \pm 1,3 \times 10^{11}$.

Средняя концентрация тромбоцитов при заготовке в обеих группах КТ составила $6,85 \times 10^{11}$, средний объем КТ — 458,46 мл.

Морфологические изменения

Среднее содержание тромбоцитов во всех группах КТ (по способу заготовки) на протяжении всего периода хранения не менялось, и достоверных отличий между группами не выявлено. Группы КТ-К и КТ-Rg по содержанию клеток между собой не отличались в течение хранения. В образцах КТ, заготовленных обоими способами и обработанных ИП, количество клеток было примерно в 1,2 раза меньше по сравнению с КТ-К ($p < 0,05$), что обусловлено разведением при добавлении раствора рибофлавина в количестве 35 мл. Это соотношение сохраняется в течение всего срока хранения как для образцов, заготовленных в плазме, так и в ДР.

По показателю P-LCR в обеих группах (по способу заготовки), а также между КТ-К и КТ-Rg не выявлено значимых изменений в течение 5 дней хранения. По показателю PDW внутри исследованных групп КТ по способу заготовки и между КТ-К и КТ-Rg достоверных отличий нет. К 5-му дню хранения этот показатель достоверно снижался в группе КТ-ДР ($p = 0,02$). По среднему объему тромбоцитов (MPV) внутри обеих групп, заготовленных разными способами, и между КТ-К и КТ-Rg достоверных отличий не выявлено. По морфологическим параметрам MPV, P-LCR и PDW отмечается достоверное увеличение всех величин к 5-му дню хранения в группах КТ-плазма и КТ-ДР, обработанных по технологии ИП, но они не выходят за рамки референсных значений. Графически динамика значений параметров представлена на рис. 1а — в.

Таким образом, достоверные отличия по MPV, P-LCR и PDW между группами КТ-плазма и КТ-ДР не выявлены в течение всего периода хранения. Rg-облучение не влияет на изменение исследованных морфологических параметров во всех КТ, независимо от способа заготовки КТ. Указанная закономерность справедлива как для образцов, заготовленных в плазме, так и в ДР. Это важно для сохранения посттрансфузионной выживаемости тромбоцитов.

После обработки КТ (заготовленных обоими способами) по технологии ИП отмечается повышение параметров клеток MPV, P-LCR и PDW. К концу хранения происходит увеличение и разбухание клеток [11], что объясняется и воздействием ультрафиолетовых лучей спектров В и С [18].

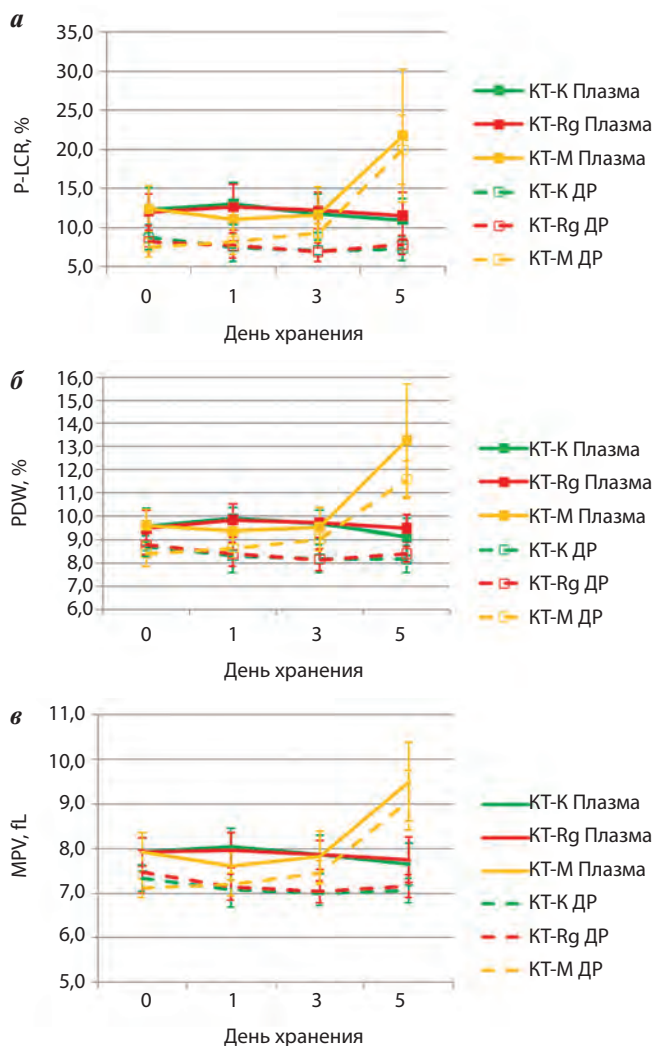


Рис. 1. Динамика морфологических параметров тромбоцитов в процессе хранения: а — изменения индекса P-LCR в группах КТ, заготовленных и обработанных разными способами, в течение срока хранения; б — величина PDW в группах КТ, заготовленных и обработанных разными способами, в течение срока хранения; в — величина MPV в группах КТ, заготовленных и обработанных разными способами, в течение срока хранения

Спонтанная экспрессия маркеров активации и апоптоза в зависимости от метода заготовки и сроков хранения

По результатам исследования антигенной структуры тромбоцитов в обеих группах (КТ-плазма и КТ-ДР) наблюдалось статистически значимое увеличение уровней экспрессии Р-селектина (CD62P) и содержания ФС (связывание аннексина V) в течение всего периода наблюдения.

Сразу после заготовки в обеих группах КТ наблюдался одинаково низкий уровень экспрессии Р-селектина в КТ-плазма — 0,2–5,7 % и в КТ-ДР — 0,3–5,1 %. Далее (1-й и 3-й дни) в процессе хранения отмечается достоверное повышение степени активации тромбоцитов в КТ, заготовленных в плазме, по сравнению с КТ, заготовленных в ДР ($p = 0,01$).

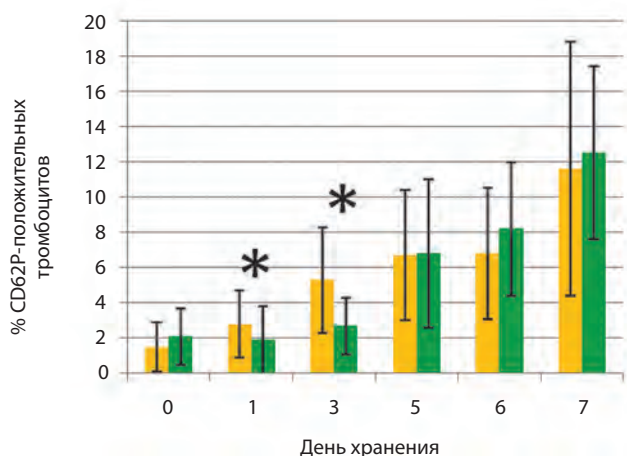


Рис. 2. Спонтанная активация в КТ (доля CD62P-положительных тромбоцитов): * — $p < 0,05$.

и $p = 0,0004$). Содержание CD62P-положительных клеток в КТ-плазма на 1-й день после заготовки составляет 0,5–7,9 %, на 3-й день — 1,3–12 %; в КТ-ДР — 0,3–6,2 % и 0,5–6,3 % соответственно. Отмечается дальнейшее повышение активации клеток на 5-й день хранения по сравнению с днем заготовки в группе КТ-плазма в 4,5 раза, в КТ-ДР — почти в 3,2 раза. Достоверных отличий по экспрессии Р-селектина на 5-й день между группами КТ-плазма и КТ-ДР не выявлено ($p = 0,62$). На 6–7-й дни хранения экспрессия Р-селектина возрастает в КТ (оба способа заготовки) по сравнению с 0-м днем хранения в 7,7 раза (КТ-плазма) и в 6 раз (КТ-ДР). Динамика экспрессии Р-селектина представлена на рис. 2.

Непосредственно после заготовки в обеих группах КТ отмечается низкий уровень ФС: в КТ-плазма — 0,3–1,6 %; в КТ-ДР — 0,4–1,1 %. На 1-й и 3-й дни хранения содержание ФС в КТ, заготовленных с использованием ДР, оказалось достоверно ниже в 1,5–2 раза ($p = 0,003$ и $p = 0,0001$), чем в КТ, заготовленных в плазме. На 5-й день содержание ФС достоверно ниже в 1,2 раза в группе КТ-ДР, чем в группе КТ-плазма ($p = 0,045$). На 6–7-й дни хранения доля аннексин-положительных клеток в КТ-плазма и в КТ-ДР возрастает более чем в 6 раз.

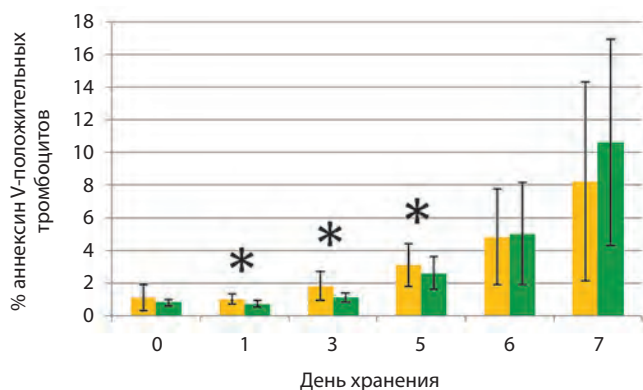


Рис. 3. Спонтанная активация в КТ (доля ФС-положительных тромбоцитов): * — $p < 0,05$.

Динамика содержания аннексин-положительных тромбоцитов представлена на рис. 3.

В исследовании [3] показано, что при заготовке КТ с ДР значительно сокращается интенсивность гликолиза (меньшее потребление глюкозы и снижение образования лактата), что обеспечивает более низкую степень экспрессии маркеров активации и апоптоза. Эти же данные подтверждает другое исследование [10]. А более низкая степень активации указанных маркеров может прогнозировать большую эффективность тромбоцитов *in vivo*.

Таким образом, можно сделать выводы, что низкая экспрессия обоих исследуемых маркеров в КТ сразу после заготовки указывает на качественную платформу афереза АКТ. В дальнейшем в процессе хранения клетки меньше активируются при заготовке КТ в ДР, чем в плазме, и уровень экспрессии маркера апоптоза также ниже, чем в КТ-плазма.

Спонтанная экспрессия маркеров активации и апоптоза в зависимости от способа обработки

Сразу после заготовки в группах КТ-плазма и КТ-ДР в образцах КТ-К и КТ-Рг наблюдался одинаково низкий уровень экспрессии Р-селектина (0,4–9,9 %). В образцах КТ, обработанных ИП, уровень экспрессии Р-селектина был несколько выше (2,5–10,6 %) — в КТ-плазма в 2,2 раза, в КТ-ДР — в 4,3 раза. На 1-й и 3-й дни хранения экспрессия Р-селектина в группах КТ-К и КТ-Рг, заготовленных в ДР, достоверно ниже, чем в КТ-К и КТ-Рг, заготовленных в плазме. Экспрессия Р-селектина в КТ-М, заготовленных в плазме, выше, чем в КТ-К, в 3,2 раза. Экспрессия Р-селектина в КТ-М, заготовленных в ДР, выше, чем в КТ-К — в 5 раз. При этом экспрессия Р-селектина достоверно выше в группе КТ-М, заготовленных в плазме, по сравнению с КТ-М, заготовленных в ДР. На 5-й день хранения экспрессия Р-селектина в КТ-М, заготовленных в плазме и с ДР, выше, чем в КТ-К соответственно в 5,6 раза и 5,1 раза. Динамика экспрессии Р-селектина представлена на рис. 4.

Спонтанная экспрессия Р-селектина практически не меняется во всех группах КТ в течение хранения,

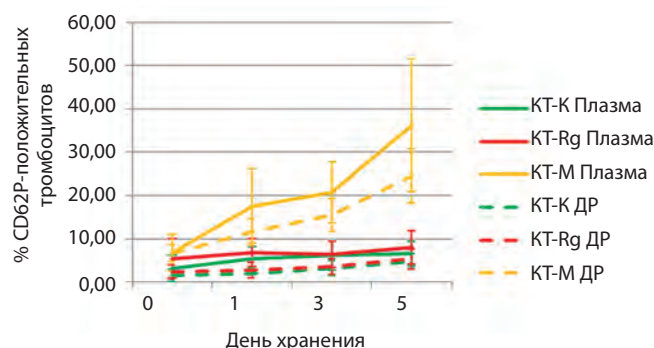


Рис. 4. Спонтанная экспрессия Р-селектина (CD62P) в зависимости от способа обработки и сроков хранения КТ

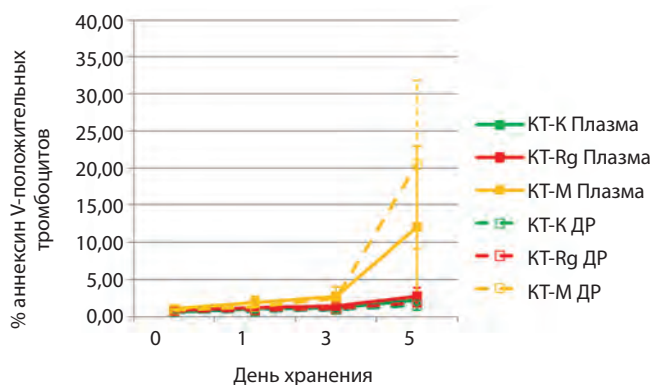


Рис. 5. Доля ФС-положительных тромбоцитов в зависимости от способа обработки и сроков хранения КТ

за исключением групп КТ, обработанных ИП (по сравнению с КТ-К; $p < 0,05$). Обработка ИП приводит к увеличению активации тромбоцитов, а следовательно, к снижению их функциональной активности и проявляется в снижении клинической эффективности.

Содержание ФС во всех группах КТ в течение срока хранения сохранялось на низком уровне, за исключением групп КТ, обработанных ИП. При этом отмечаются достоверные различия между контрольной группой и группой КТ, подвергнутых процедуре инактивации, в течение всего срока хранения, начиная с 0-го дня. Содержание ФС в КТ-ДР, обработанных по технологии ИП, значительно выше к 5-му дню по сравнению с КТ-плазма, обработанных по технологии ИП. Это может быть связано с истощением запасов глюкозы или недостаточной буферной емкостью среды в КТ, заготовленных с ДР [17]. Динамика содержания ФС-положительных тромбоцитов представлена на рис. 5.

Достоверное увеличение спонтанной активации Р-селектина и ФС (в течение всего периода наблюдения) в клетках при обработке КТ по технологии с применением ультрафиолета + рибофлавина указывает на снижение функциональной активности и жизнеспособности тромбоцитов в процессе хранения, а значит, и клиническая эффективность при трансфузиях таких целевых клеток понижается.

Индукцированная экспрессия маркеров активации и апоптоза в зависимости от способа обработки

При индуцированной активации CRP уровень экспрессии Р-селектина был высоким на момент заготовки и сохранялся на высоком уровне во всех группах в течение хранения, за исключением КТ, обработанных ИП. В КТ, обработанных ИП, отмечается снижение уровня индуцированной экспрессии Р-селектина к 5-му дню хранения, при этом уровень экспрессии в КТ с ДР, обработанных ИП, значительно ниже по сравнению с КТ-плазма, подвергнутых ИП. Таким образом, тромбоциты в КТ без обработки ИП сохраняют свою функциональную активность, в отличие от клеток, подвергнутых воздействию ИП: их от-

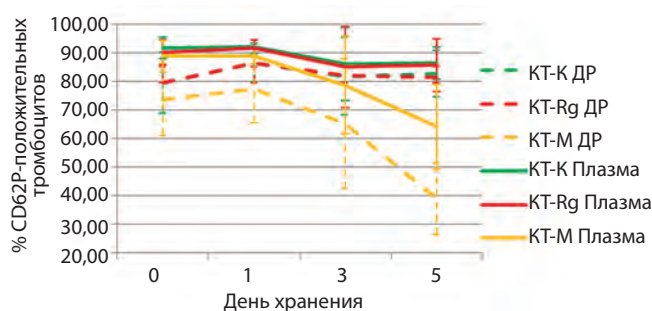


Рис. 6. Индуцированная экспрессия Р-селектина (CD62P) в зависимости от способа обработки и сроков хранения КТ

вет на индуктор был ниже уже в 0-й день наблюдения после заготовки и обработки и снижался в течение всего срока хранения (рис. 6).

Содержание ФС сразу после заготовки при активации CRP находится на одном уровне во всех группах КТ-К, КТ-Rg и КТ-М для образцов, заготовленных в плазме и ДР, и составляет 17–22 %. При хранении в течение 5 дней во всех образцах наблюдается снижение содержания ФС после активации CRP, в образцах КТ-К и КТ-Rg, заготовленных в ДР, причем это снижение более плавное, чем в остальных образцах (рис. 7). Для образцов КТ-М, заготовленных в плазме и в ДР, кривые практически совпадают с образцами КТ-К и КТ-Rg в плазме до 3-го дня, а на 5-й день наблюдается резкое возрастание экспрессии ФС в образцах КТ-М до уровня, наблюдаемого в этих образцах без активации CRP.

Описанные закономерности свидетельствуют об общей тенденции к снижению активационного потенциала тромбоцитов в процессе хранения, причем наиболее интенсивное снижение наблюдалось в группах КТ, обработанных по технологии ультрафиолет + рибофлавин. Нарастание доли ФС-положительных тромбоцитов к 5-му дню хранения в указанных группах может быть обусловлено перестроением архитектоники липидов мембраны [15], ассоциированным с началом процесса апоптоза как формы ответа истощенных клеток на стимуляцию CRP.

Полученные данные по спонтанной и индуцированной экспрессии маркеров активации и апоптоза согласуются с результатами исследования [19].

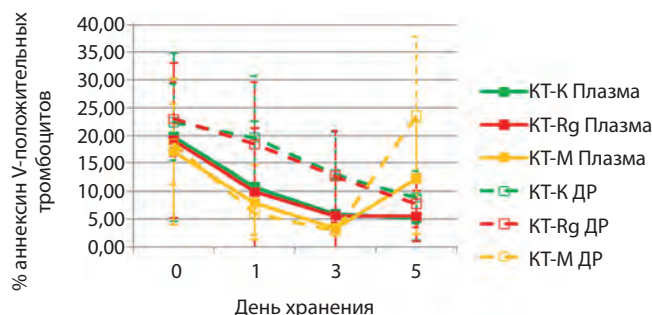


Рис. 7. Доля ФС-положительных тромбоцитов после активации CRP в зависимости от способа обработки и сроков хранения КТ

При обработке КТ-плазма по технологии ультрафиолет + рибофлавин доля тромбоцитов, спонтанно экспрессирующих Р-селектин, увеличивалась в процессе хранения. А при индуцированной активации количество Р-селектин-позитивных клеток снижалось в процессе хранения более интенсивно в обработанных КТ по сравнению с контрольной группой.

Выводы

Проанализированы морфологические и функциональные характеристики КТ, заготовленных методом афереза с использованием ДР. Полученные результаты показали, что использование ДР, по сравнению с плазмой, снижает спонтанную активацию тромбоцитов и способствует сохранению функциональной активности и жизнеспособности клеток при хранении КТ. Морфологические признаки тромбоцитов при обоих способах заготовки КТ были неизменными, а интенсивность процессов метаболизма в КТ с ДР была ниже, чем в КТ, заготовленных в плазме. Таким образом,

условия хранения КТ с ДР обеспечивают стабильность метаболических процессов в течение всего периода хранения КТ. Благодаря применению синтетических взвешивающих растворов в сочетании с оптимизированными сетами для заготовки КТ и контейнерами для хранения можно обеспечить сохранение качества тромбоцитов до переливания.

При исследовании функционального потенциала тромбоцитов выявлены более низкие уровни Р-селектина и ФС в КТ, заготовленных с ДР; не наблюдались значимые изменения по экспрессии указанных маркеров в течение всего периода хранения обеих групп КТ при их обработке рентгеновским облучением. Показано, что обработка КТ по технологии ИП с применением ультрафиолет + рибофлавин влияет на морфофункциональные характеристики тромбоцитов, что проявляется в увеличении морфологических параметров клеток к 5-му дню хранения. Обработка КТ по технологии ИП приводит к нарастанию спонтанной активации тромбоцитов и запуску в них апоптоза к 5-м суткам хранения.

ЛИТЕРАТУРА

- Донсков С.И., Липатова И.С. Аллоиммунизация антигенами эритроцитов — глобальный популяционный процесс. Гематологический научный центр РАМН РФ. Вестник службы крови России 2001;3:18. [Donskov S.I., Lipatova I.S. Alloimmunization of erythrocyte antigens — the global population processes. Hematological Research Centre. Vestnik sluzhby krovi Rossii = Bulletin of Russian Blood Service 2001;3:18. (In Russ.)].
- Жибурт Е.Б., Вергопуло А.А., Губанова М.Н., Копченко Т.Г. Эффективность донорства крови и тромбоцитов в субъектах Российской Федерации. ГлавВрач 2009;2:23–9. [Zhiburt E.B., Vergopulo A.A., Gubanova M.N., Kopchenko T.G. Effectiveness of blood and platelets donation in the Russian Federation. GlavVrach = Head Physician 2009;2:23–9. (In Russ.)].
- Карпова О.В., Ройтман Е.В., Колесникова И.М. и др. Метаболические изменения при хранении тромбоцитарных концентратов, заготовленных разными методами. Трансфузиология 2014;3(15):30–2. [Karpova O.V., Roytman E.V., Kolesnikova I.M. et al. Metabolic changes during storage of platelet obtained by different techniques. Transfusiologiya = Transfusiology 2014;3(15):30–2. (In Russ.)].
- Филатов Ф.П., Голосова Т.В. Общие принципы национальной концепции вирусной безопасности гемотрансфузий. Гематология и трансфузиология 2001;3:84–6. [Filatov F.P., Golosova T.V. The general principles of the national concept of blood transfusions viral safety. Gematologiya i transfusiologiya = Hematology and Transfusiology 2001;3:84–6. (In Russ.)].
- Шевченко Ю.Л., Жибурт Е.Б. Безопасное переливание крови: руководство для врачей. СПб.: Питер, 2000. 320 с. [Shevchenko Yu.L., Zhiburt E.B. Safe blood transfusion: Physicians Guide. St.-Petersburg: Piter, 2000. 320 pp. (In Russ.)].
- Azuma H., Hirayama J., Akino M. et al. Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). Transfusion 2009;49:214–8.
- Cardo L.J., Rentas F.J., Ketchum L. et al. Pathogen Inactivation of Leishmania donovani infantum in Plasma and Platelet Concentrates Using Riboflavin and Ultraviolet Light. Vox Sang 2006;90(2):85–91.
- Cardo L.J., Salata J., Mendez J. et al. Pathogen Inactivation of Trypanosomacruzi in Plasma and Platelet Concentrates Using Riboflavin and Ultraviolet Light. Transfus Apher Sci 2007;37(2):131–7.
- Cookson P., Sutherland J., Turner C. et al. Platelet apoptosis and activation in platelet concentrates stored for up to 12 days in plasma or additive solution. Transfus Med 2010;20(6):392–402.
- Diedrich B., Sandgren P., Jansson B. In vitro and in vivo effects of potassium and magnesium on storage up to 7 days of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution. Vox Sang 2008;94(2):96–102.
- Ezaki S., Kanno T., Ohto H. et al. Survival and recovery of apheresis platelets stored in a polyolefin container with high oxygen permeability. Vox Sang 2008;94(4):292–8.
- Fontana S., Summermatter R., Vogt M. et al. Comparison of the transfusion efficacy of multiple dose Amicus platelet concentrates collected in plasma or PASIII additive solution. Vox Sang 2011;101s1:135.
- Goodrich R.P., Edrich R.A., Li J., Seghatchian J. The Mirasol PRT System for Pathogen Reduction of Platelets and Plasma: An Overview of Current Status and Future Trends. Transfus Apher Sci 2006;35(1):5–17.
- Goodrich R.P., Edrich R.A., Goodrich L.L. et al. Silva E. and A.M. Edwards (eds.). The Antiviral and Antibacterial Properties of Riboflavin and Light: Applications to Blood Safety and Transfusion Medicine. Flavins: Photochemistry and Photobiology, The Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, 2006. Pp. 83–113.
- Gyulkhandanyan A.V., Mutlu A., Freedman J., Leytin V. Markers of platelet apoptosis: methodology and applications. J Thromb Thrombolysis 2012;33(4):397–411.
- Holme S. Storage and quality assessment of platelets. Vox Sang 1998;74(2):207–16.
- Julmy F., Ammann R.A., Mansouri T.B. et al. Effects of high-yield thrombocytapheresis on the quality of platelet products. Transfusion 2008;48(3):442–50.
- Li J., Goodrich L., Hansen E. et al. Platelet glycolytic flux increases stimulated by ultraviolet-induced stress is not the direct cause of platelet morphology and activation changes: possible implications for the role of glucose in platelet storage. Transfusion 2005;45:1750–8.

19. Middelburg R.A., Roest M., Ham J. et al. Flow cytometric assessment of agonist-induced P-selectin expression as a measure of platelet quality in stored platelet concentrates. *Transfusion* 2013;53(8):1780–7.
20. Murphy M.F., Waters A.H. Clinical aspects of platelet transfusions. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991;2:389–96.
21. Murphy S. Utility of *in vitro* tests in predicting the *in vivo* viability of stored PLTs. *Transfusion* 2004;44:618–19.
22. Procházková R., Andrys C., Hubácková L., Krejsek J. Markers of platelet activation and apoptosis in platelet concentrates collected by apheresis. *Transfus Apher Sci* 2007;37(2):115–23.
23. Rentas F., Harman R., Gomez C. et al. Inactivation of Orientiat sutsugamushi in Red Blood Cells, Plasma, and Platelets with Riboflavin and Light, As Demonstrated in an Animal Model. *Transfusion* 2007;47(2):240–7.
24. Rinder H.M., Murphy M., Mitchell J.G. et al. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion* 1991;31(5):409–14.
25. Ruane P.H., Edrich R., Gampp D. et al. Photochemical Inactivation of Selected Viruses and Bacteria in Platelet Concentrates Using Riboflavin and Light. *Transfusion* 2004;44(6):877–85.
26. Seghatchian J. Platelet storage lesion: an update on the impact of various leukoreduction processes on the biological response modifiers. *Transfus Apher Sci* 2006;34(1):125–30.
27. Tynngard N., Trinks M., Berlin G. *In vitro* properties of platelets stored in three different additive solutions. *Transfusion* 2012;52:1003–9.
28. Wildt-Eggen J., Nauta S., Schrijver J.G. et al. Reactions and platelet increments after transfusion of platelet concentrates in plasma or an additive solution: a prospective randomized study. *Transfusion* 2000;40:398–403.



РАСКРОЙ ПОТЕНЦИАЛ

Ожидайте большего

МОЗОБАИЛ — ПЕРВЫЙ В СВОЕМ КЛАССЕ ПРЕПАРАТ ДЛЯ МОБИЛИЗАЦИИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК



МОЗОБАИЛ
(плериксафор)

SANOFI ONCOLOGY 

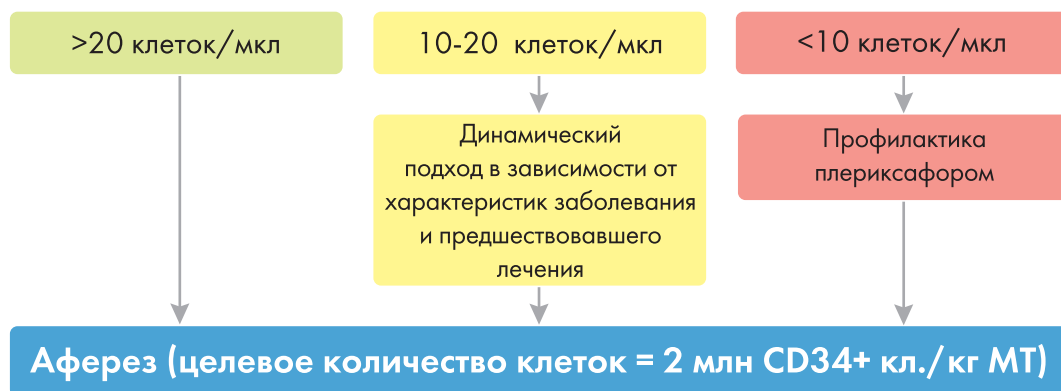
ЗАО «Санофи Россия»,
125009, Москва, ул. Тверская, д. 22.
Тел.: (495) 721 14 00. Факс: (495) 721 14 11
www.sanofi.ru

Плериксафор. Форма выпуска: Раствор для подкожного введения 20 мг/мл. По 1,2 мл раствора во флаконе. Регистрационный номер: ЛП-002352. Показания к применению: Для усиления мобилизации гемопоэтических стволовых клеток в периферический кровоток с целью их сбора и последующей аутотрансплантации пациентам с лимфомой и множественной миеломой в сочетании с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ). Противопоказания: Повышенная чувствительность к плериксафору или любым вспомогательным веществам препарата; беременность; лактация; детский и подростковый возраст до 18 лет (в связи с отсутствием опыта применения). Дозы: Рекомендованная доза плериксафора составляет 0,24 мг/кг/сут. Препарат вводят подкожно за 6-11 ч до начала афереза после предварительной четырехдневной терапии Г-КСФ. В клинических исследованиях препарат Мозобайл обычно использовался в течение 2-4 дней подряд. С подробной информацией о препарате можно ознакомиться в инструкции по применению.

RU.PLE.14.08.24

Изложение позиции экспертов Европейского общества по трансплантации костного мозга: Мобилизация аутологических гемопоэтических стволовых клеток у больных множественной миеломой и лимфомой¹

Количество CD34+ клеток в ПК до афереза



ПК – периферическая кровь,
МТ – масса тела
* не требуется проактивное вмешательство

Предсказывающие факторы плохой или неудачной мобилизации:

- Возраст
 - Пожилой возраст пациентов
- Заболевание
 - Поздняя фаза заболевания
- Предшествующая химиотерапия
 - Большое количество линий химиотерапии
 - Вид химиотерапии (флударабин, леналидомид (спорный) или мелфалан)
- Предшествующее облучение зоны костного мозга
- Низкое количество CD34+ клеток в ПК до афереза
- Низкие количества тромбоцитов до мобилизации (спорный)

Международная классификация болезней (МКБ-10)²

C81-C96 Злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей

C81 Болезнь Ходжкина [лимфогранулематоз]

- C81.0 Болезнь Ходжкина - лимфоидное преобладание
- C81.1 Болезнь Ходжкина - нодулярный склероз
- C81.2 Болезнь Ходжкина - смешанно-клеточный вариант
- C81.3 Болезнь Ходжкина - лимфоидное истощение
- C81.7 Другие формы болезни Ходжкина
- C81.9 Болезнь Ходжкина неуточненная

C82 Фолликулярная [нодулярная] неходжкинская лимфома

- C82.0 Мелкоклеточная лимфома с расщепленными ядрами, фолликулярная
- C82.1 Смешанная, мелкоклеточная лимфома с расщеплен. ядрами и крупноклеточная
- C82.2 Крупноклеточная лимфома, фолликулярная
- C82.7 Другие типы фолликулярной неходжкинской лимфомы
- C82.9 Фолликулярная неходжкинская лимфома неуточненная

C83 Диффузная неходжкинская лимфома

- C83.0 Лимфома мелкоклеточная (диффузная)
- C83.1 Лимфома мелкоклеточная с расщепленными ядрами (диффузная)
- C83.2 Лимфома смешанная мелко- и крупноклеточная (диффузная)
- C83.3 Лимфома крупноклеточная (диффузная) - ретикулосаркома
- C83.4 Лимфома иммунобластная (диффузная)

C83.5 Лимфома лимфобластная (диффузная)

- C83.6 Лимфома недифференцированная (диффузная)
- C83.7 Опухоль Беркита
- C83.8 Другие типы диффузных неходжкинских лимфом
- C83.9 Диффузная неходжкинская лимфома неуточненная

C84 Периферические и кожные Т-клеточные лимфомы

- C84.0 Грибовидный микоз
- C84.1 Болезнь Сезари
- C84.2 Лимфома Т-зоны
- C84.3 Лимфоэпителиоидная лимфома (лимфома Леннерта)
- C84.4 Периферическая Т-клеточная лимфома
- C84.5 Другие неуточненные Т-клеточные лимфомы

C85 Другие неуточненные типы неходжкинской лимфомы

- C85.0 Лимфосаркома
- C85.1 В-клеточная лимфома неуточненная
- C85.7 Другие уточненные типы неходжкинской лимфомы
- C85.9 Неходжкинская лимфома неуточненного вида

C88 Злокачественные иммунопролиферативные болезни

- C88.0 Макроглобулинемия Вальденстрема
- C88.1 Болезнь альфа-тяжелых цепей
- C88.2 Болезнь гамма-тяжелых цепей
- C88.3 Иммунопролиферативная болезнь тонкого кишечника

C88.7 Другие злокачественные иммунопролиферативные болезни

- C88.9 Злокачественные иммунопролиферативные болезни неуточненные
- C90 Множественная миелома и злокачественные плазмноклеточные новообразования
- C90.0 Множественная миелома
- C90.1 Плазмноклеточный лейкоз
- C90.2 Плазмоцитома экстрамедуллярная

C91 Лимфоидный лейкоз [лимфолейкоз]

- C91.0 Острый лимфобластный лейкоз
- C91.1 Хронический лимфоцитарный лейкоз
- C91.2 Подострый лимфоцитарный лейкоз
- C91.3 Пролимфоцитарный лейкоз
- C91.4 Волосатоклеточный лейкоз (лейкемический ретикулоэндотелиоз)
- C91.5 Т-клеточный лейкоз взрослых
- C91.7 Другой уточненный лимфоидный лейкоз
- C91.9 Лимфоидный лейкоз неуточненный

C92 Миелоидный лейкоз [миелолейкоз]

- C92.0 Острый миелоидный лейкоз
- C92.1 Хронический миелоидный лейкоз
- C92.2 Подострый миелоидный лейкоз
- C92.3 Миелоидная саркома (хлорома, гранулоцитарная саркома)
- C92.4 Острый промиелоцитарный лейкоз
- C92.5 Острый миеломоноцитарный лейкоз
- C92.7 Другой миелоидный лейкоз
- C92.9 Миелоидный лейкоз неуточненный

C93 Моноцитарный лейкоз

- C93.0 Острый моноцитарный лейкоз
- C93.1 Хронический моноцитарный лейкоз
- C93.2 Подострый моноцитарный лейкоз

C93.7 Другой моноцитарный лейкоз

- C93.9 Моноцитарный лейкоз неуточненный

C94 Другой лейкоз уточненного клеточного типа

- C94.0 Острая эритремия и эритролейкоз
- C94.1 Хроническая эритремия
- C94.2 Острый мегакариобластный лейкоз
- C94.3 Тучноклеточный лейкоз
- C94.4 Острый панмиелолейкоз
- C94.5 Острый миелофиброз
- C94.7 Другой уточненный лейкоз

C95 Лейкоз неуточненного клеточного типа

- C95.0 Острый лейкоз неуточненного клеточного типа
- C95.1 Хронический лейкоз неуточненного клеточного типа
- C95.2 Подострый лейкоз неуточненного клеточного типа
- C95.7 Другой лейкоз неуточненного клеточного типа
- C95.9 Лейкоз неуточненный

C96 Другие и неуточненные злокачественные новообразования лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей

- C96.0 Болезнь Леттерера-Сиве (нелипидный ретикулоэндотелиоз, ретикулез)
- C96.1 Злокачественный гистиоцитоз
- C96.2 Злокачественная тучноклеточная опухоль
- C96.3 Истинная гистиоцитарная лимфома
- C96.7 Др. уточненные ЗНО лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей
- C96.9 ЗНО лимфоидной, кроветворной и родственных им тканей неуточненные

1. Mohty M., Hübel K., Kröger N., et al. Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant. 2014 Jul; 49(7): 865-72.
2. Международная классификация болезней 10-го пересмотра, одобрена 43-ей сессией Всемирной ассамблеи здравоохранения в мае 1990 г. и вошла в употребление в государствах-членах ВОЗ с 1994 г., утверждена пр. Л/З РФ № 170 от 27.05.1997 г.

ОТ РЕДАКЦИИ / FROM EDITION



Чем выше эффективность лечения ранее фатальных заболеваний гемопоэтической системы — злокачественных и не только, тем очевиднее раздвигаются границы казалось бы решенных проблем. Давно стало очевидно, что мало спасти жизнь больного — чего же большего может желать врач! — но одновременно возникает не менее трудная задача — постараться включить в это понятие и увеличение ее продолжительности и качества.

Во многих странах действуют программы, где расписаны подробные рекомендации по наблюдению за излечившимися бывшими пациентами, эти проблемы стоят в ряду важных социальных задач.

К сожалению, в нашей стране нет единых программ наблюдения за подобными пациентами в разные сроки после завершения терапии, кроме общих указаний сроков контроля и рекомендаций без учета характера болезни, полученного лечения и других многочисленных составляющих, которые должны быть приняты во внимание при определении тактики и стратегии контроля и реабилитации этой уже значительной части населения.

Журнал начинает публиковать работы, посвященные этой тематике, в основу которых положена не столько оценка состояния отдельных органов и систем, но комплексные определения функциональных возможностей организма. Особое значение это имеет для педиатрии, поскольку в детском возрасте реабилитация компрометированных болезнью и весьма токсичной терапией функций должна проходить одновременно с их становлением в результате нормального биологического развития.

Публикаций, посвященных этой тематике, включающей такие понятия, как «поздние эффекты лечения» и «возможность вести максимально приближенный к обычному образ жизни», в отечественной специальной литературе очень мало. Надеемся, что представленная работа привлечет ваше внимание и положит начало серьезному разговору. Без поддержки органов здравоохранения и системы образования эти вопросы не могут быть решены.