

ОПЫТ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ СЛУЖБЫ КРОВИ РОССИИ

Кирыянова Г.Ю., Волкова С.Д., Гришина Г.В., Ефимова Т.А.

*ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург,
ул. 2-я Советская, д.16, т.(812)274-56-50, bloodscience@mail.ru*

Резюме: В статье дано обоснование необходимости лейкодеплеции и карантинизации гемокомпонентов для повышения иммунологической и инфекционной безопасности их трансфузий. Представлены этапы разработки отечественных фильтрующих устройств, предназначенных для лейкоредукции крови, эритромаcсы и плазмы. Предложена технология заготовки лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов. Показаны отсутствие негативного влияния предварительной лейкофилтрации на сохранность морфофункциональных свойств красных клеток крови в процессе криоконсервирования и пригодность данной эритроцитной среды для трансфузий.

Ключевые слова: лейкодеплеция, гемокомпоненты, отечественные устройства, безопасность, криоконсервирование, карантинизация.

DEVELOPMENT EXPERIENCE OF NEW TECHNOLOGIES FOR RUSSIAN BLOOD SERVICE

Kiryanova G.U., Volkova S.D., Grishina G.V., Efimova T.A.

*FGBU «Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology
Federal medico-biological Agency», St. Peterburg*

Abstract: The article gives a substantiation of haemocomponents leukodepletion and quarantine to increase the immunological and infectious safety of transfusions. Development stages of domestic devices for leukoreduction of blood, RBCs and plasma are presented. And here is offered a method for preparation leukodepleted quarantined erythrocytes. It is proved that leukofiltration has no negative impact on the morfo-functional properties of erythrocytes in the process of their cryopreservation, and that the erythrocyte medium is useful for transfusion.

Keywords: leukodepletion, haemocomponents, domestic leukoreduction filters, safety, cryopreservation, quarantine.

Введение

Важным звеном в повышении иммунологической и инфекционной безопасности гемотрансфузионной терапии является лейкоредукция компонентов крови.

Проблема удаления лейкоцитов из гемокомпонентов первоначально возникла в контексте борьбы с негемолитическими посттрансфузионными температурными реакциями. Было доказано, что наиболее частыми причинами этих реакций являются иммунное взаимодействие HLA- и специфичных антигранулоцитарных антител реципиента с лейкоцитами донора, а при отсутствии аллоантител – цитокины, накапливающиеся в лейкоцитсодержащих гемотрансфузионных средах при их хранении [1, 2, 3, 4].

В дальнейшем было показано, что уменьшение примеси лейкоцитов в клеточных компонентах крови существенно улучшает условия их хранения за счет снижения гемолитического действия протеолитических ферментов разрушающихся лейкоцитов, а также замедляет темпы накопления гидроперекисей липидов [5]. Кроме того, удаление из эритроцитной среды лейкоцитов и тромбоцитов замедляет процесс формирования микросгустков, содержание которых в нефилтрованной консервированной крови или эритроцитной массе (ЭМ) на 2-3-й неделе хранения может достигать 10 г/л [6]. Попадая в легкие, особенно при массивных трансфузиях, они вызывают не только микроэмболию, но и оказывают токсическое действие на легочные микрососуды, вызывая повреждение эндотелия, нарушение проницаемости сосудов. В результате может развиться тяжелая форма легочно-сердечной недостаточности. Паллиативным мероприятием в профилактике данного осложнения является фильтрация гемотрансфузионных сред через сетчатые фильтры устройств для переливания, более эффективным – через устройства с микрофильтром. Радикально эту проблему решает удаление лейкоцитов до хранения.

Важно отметить, что на долю трансфузионных осложнений, связанных с введением аллогенных лейкоцитов, приходится 90% всех реакций, обусловленных переливанием компонентов крови [7]. Снижение содержания лейкоцитов в дозе переливаемой среды до уровня 1×10^6 (лейкодеплегия, лейкоредукция) предупреждает развитие аллоиммунизации реципиента и возникающей как ее следствие рефрактерности к трансфузиям аллогенных тромбоцитов, а также снижает риск развития РТПХ [8, 9].

Кроме того, итальянские коллеги (Pagliaro P., 2009) выявили феномен снижения частоты аллоиммунизации к антигенам эритроцитов при внедрении в трансфузиологическую практику элиминации лейкоцитов из крови и ее компонентов [10].

Трансфузии лейкоцитсодержащих сред могут вызвать эффект иммуносупрессии. В ряде исследований последних лет показано снижение частоты инфекционных осложнений и случаев летальности в хирургической (в том числе кардиохирургической) практике при использовании лейкоредуцированных гемокомпонентов [11, 12, 13].

Лейкодеплеция гемотрансфузионных сред значительно повышает не только иммунологическую, но и инфекционную безопасность их трансфузий [14, 15]. Известно, что более 90% взрослого населения городов инфицировано одним или несколькими штаммами герпесвирусов (1 - 8 типов). Большинство этих вирусов пожизненно персистируют в организме, и у 8-20% инфицированных они реактивируются под влиянием различных экзо- и эндогенных провоцирующих факторов. Эти люди могут оказаться среди донорского контингента. Герпесвирусная инфекция в организме с нормальной иммунной системой часто протекает бессимптомно, но у реципиентов с иммуносупрессией может вызывать тяжелые, в том числе злокачественные заболевания.

Лейкофильтрация позволяет значительно снизить вероятность трансмиссии не только вирусов (цитомегаловируса, вируса Эпштейна-Барр, Т-лимфотропного вируса человека I и II типа, парвовирусов и др.) и риккетсий (*Orientia tsutsugamushi*), являющихся лейкоцитассоциированными инфекционными агентами [16, 17, 18, 19]. Она также эффективна и в отношении таких паразитических простейших как *Trypanosoma cruzi* и *Leishmania*, не связанных или связанных лишь частью жизненного цикла с клетками крови (моноцитами и макрофагами для *Leishmania*). В этом случае задержка инфекционных агентов фильтрующим материалом осуществляется не только за счет элиминации лейкоцитов, но и путем прямой адгезии экстрацеллюлярных организмов к волокнам фильтра [20, 21]. Интересно отметить, что даже эритроциты, пораженные *Plasmodium falciparum*, в значительной мере задерживаются лейкофильтрующими устройствами за счет снижения деформируемости и экспрессии фосфатидилсерина на поверхности этих клеток, что уменьшает риск заражения реципиента малярией [22].

По данным ряда авторов, более 40% зарегистрированных случаев клинического сепсиса от трансфузий эритроцитных сред приходится на инфицирование *Yersinia enterocolitica* за счет асимптоматической или слабо выраженной бактериемии у донора. В исследованиях *in vitro* показано, что удаление примесей лейкоцитов предупреждает рост и

этого патогена в процессе хранения при 4°C препаратов эритроцитов [23]. Анализ образцов фракции мононуклеарных лейкоцитов показал, что 18,5% клинически здоровых доноров инфицировано *Chlamydia pneumoniae* – микроорганизмом, обуславливающим развитие атеросклероза, бронхиальной астмы, пневмоний и артритов [24].

В свете вышеизложенного понятно, почему в большинстве развитых стран (Канада, Франция, Швейцария, Великобритания, Португалия, Новая Зеландия и др.) уже более 10 лет осуществляется обязательная универсальная лейкодеплеция компонентов крови.

Разработка отечественных устройств для удаления лейкоцитов

Известно, что механизм лейкоредукции зависит от особенностей структуры и состава фильтровального материала, но в основном он сводится к адгезии клеток (лейкоцитов и, частично, тромбоцитов) к волокну, а также к механической задержке их порами фильтра. Имеет значение также межклеточное взаимодействие лейкоцит-лейкоцит, лейкоцит-тромбоцит. В верхних слоях фильтра преимущественно за счет адгезии оседают нейтрофилы, а лимфоциты и тромбоциты задерживаются в основном механическим путем в более низких слоях [25]. На задержку лейкоцитов оказывает влияние наличие в фильтруемых средах плазмы, срок хранения крови и ее компонентов до момента фильтрования, температура фильтруемой среды и т.д. [26].

Фильтрование гемокомпонентов рекомендуется проводить не позднее, чем через 48 часов после эксфузии, но не ранее, чем через 4 – 6 часов их инкубации при температуре 22°C для завершения фагоцитоза поглощенных гранулоцитами возбудителей инфекции. Присутствие плазмы (при гематокрите не выше 0,7 л/л) способствует лучшей задержке лейкоцитов и предупреждает повреждение эритроцитов при их прохождении через фильтр.

Для лейкодеплеции за рубежом в настоящее время применяются фильтры 3-го поколения, созданные на основе гидрофобных синтетических волокон (полиэстера, полиуретана). Наиболее прогрессивным способом лейкодеплеции компонентов крови является их фильтрование *in line* в закрытой системе полимерных контейнеров, содержащих гемоконсервант (и эритроконсервант) и включающей лейкофильтр. Это допускает возможность дальнейшего хранения получаемых компонентов, независимо от условий их заготовки. Вместе с тем весьма распространена практика лейкодеплеции путем подключения (или специального стерильного подсоединения) к контейнеру с заготовленной средой отдельного устройства – лейкофильтра.

Учитывая высокую стоимость зарубежных фильтров, в 1990-х годах, по инициативе Российского НИИ гематологии и трансфузиологии начались работы по созданию отечественного устройства для удаления лейкоцитов из крови и эритроцитных сред.

Работа осуществлялась совместно с НТЦ «Мепотекс», НПП «Экофильтр», ЗАО «НПП «Интероко» и Волжским НИИ целлюлозно-бумажной промышленности, т.к. в период перестройки возникли трудности по организации разработок фильтровального материала на основе синтетических полимерных материалов с заданными параметрами.

В результате было создано первое отечественное «Устройство-лейкофильтр для удаления лейкоцитов из консервированной крови и эритроцитных сред УЛЛ-01 «Интероко», промышленный выпуск которого начался в 2000 году. Фильтровальный материал на основе целлюлозы из высших сортов экологически чистой древесины, изготовленной по специальной технологии, с добавлением синтетического волокна, в дальнейшем был усовершенствован, что позволило повысить степень задержки лейкоцитов с первоначальных 97% до 99,97%.

Представляется закономерным, что созданный первый отечественный лейкофильтр требовал дальнейшего совершенствования, однако его использование для заготовки безлейкоцитной эритроцитной массы (ЭМ), особенно по предварительным заявкам, а также для получения лейкофильтрованных отмытых эритроцитов (для определенной категории больных) и в настоящее время можно считать целесообразным [27].

Основным недостатком устройства УЛЛ-01 «Интероко» является необходимость промывания фильтра до и после фильтрации физиологическим раствором при фильтровании эритроцитарной массы. Это несколько усложняет процедуру лейкофильтрации, а главное делает невозможным хранение профильтрованной ЭМ (с примесью 0,9% NaCl) более одних суток при 4°C. Принимая во внимание это обстоятельство, а также необходимость, по современным представлениям, лейкодеплеции не только клеточных компонентов крови, но и плазмы, в 2004 году нами, совместно с НТЦ «Мепотекс», разработан новый метод лейкофильтрации компонентов крови, включающий оригинальную технологию и применение «Комплекта устройств полимерных для удаления лейкоцитов и получения безлейкоцитных компонентов консервированной крови, однократного применения, «Лейкосеп»®. Принципиальным отличием и преимуществами предложенного метода являются:

- получение двух обедненных лейкоцитами компонентов крови одного донора (в результате последовательной фильтрации плазмы и ЭМ) с помощью одного устройства;

- наличие специального коннектора для стерильного подсоединения иглы «Лейкосеп»[®] к контейнеру с фильтруемой средой, обеспечивающего проведение всей процедуры лейкодеплеции в закрытой системе;
- снижение потерь компонентов за счет уменьшения объема фильтровального узла и наличия обходных магистралей для вытеснения из него воздухом остатков эритроцитов;
- возможность выделить при необходимости лейкотромбослой.

Отсутствие необходимости промывания фильтровального узла и осуществление процесса лейкофльтрации в закрытой системе обеспечивают возможность хранения обедненной лейкоцитами ЭМ и плазмы (при общепринятых температурных режимах). Длительность хранения ЭМ зависит от используемого гемоконсерванта. Данные, полученные при сравнительном изучении красных клеток, хранившихся в течение 3-х недель (гемоконсервант «Глюгицир»), свидетельствует, что профильтрованные эритроциты в процессе хранения при 4°C по всем показателям не только не уступают, но и по морфологии, уровню гемолиза, а также содержанию АТФ являются более полноценными по сравнению с контролем (ЭМ, не подвергавшейся лейкодеплеции). Важно отметить, что степень гемолиза лейкофильтрованной ЭМ в конце срока хранения $0,07 \pm 0,010\%$, что более чем в 10 раз ниже допустимой Европейскими стандартами – $0,8\%$. Результаты исследований еще раз подтверждают мнение о том, что удаление лейкоцитов способствует лучшей сохранности эритроцитов при их консервировании.

Устройство обеспечивает коэффициент фильтрации лейкоцитов – $99,96 \pm 0,010\%$, содержание остаточных лейкоцитов в дозе ЭМ – $0,75 \pm 0,113 \times 10^6$, лейкодеплецию плазмы до $3,8 \pm 0,07 \times 10^4$ /доза (исследования проводились через 18 часов после заготовки и фракционирования крови, после ее хранения при температуре 4°C). Показана возможность лейкодеплеции эритроцитной взвеси (вместо ЭМ) в рамках утвержденной технологии.

Устройство «Лейкосеп»[®] производится ЗАО «НПП «Интероко» с 2005 года.

Ранняя лейкодеплеция крови и эритроцитных сред через устройства УЛЛ-01 и «Лейкосеп» обеспечивает, по нашим данным, отсутствие при их хранении нарастания концентраций продуктов распада лейкоцитов и тромбоцитов, в частности, миелопероксидазы, лактоферрина (табл. 1) и эластазы.

Таблица 1 – Содержание миелопероксидазы и лактоферрина во взвесах профильтрованных через УЛЛ-01 отмытых эритроцитов (опыт) и отмытых эритроцитов (контроль) в процессе хранения при 4°C в консерванте Модежель-глюофосфат

Показатели	Опыт, сутки (n=4)			Контроль, сутки (n=4)		
	1	14	21	1	14	21
Миелопероксидаза	$0 \pm 0,0^*$	$0 \pm 0,0^*$	$5,8 \pm$	$42,7 \pm$	$181,5 \pm$	$355,5 \pm$

нг/мл (N = 160 ±15)			4,90*	20,85	94,32	39,24
Лактоферрин, нг/мл (N = 1000 ±140)	0 ± 0,0*	0 ± 0,0*	8,0 ± 6,90*	580,7 ± 414,95	1412,5 ± 1054,60	4242,5 ± 714,20

Примечание: знаком * обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной серией опытов

Следует также отметить, что в лейкофильтрованной ЭМ (крови) не образуются микросгустки: на 15-е сутки – не более 50 мг/л, что соответствует их количеству после фильтрации нативной ЭМ того же срока хранения через устройства с микрофильтром (обеспечивающие удаление микроагрегатов более, чем на 95%).

В режиме пилотного исследования было проведено изучение эффективности лейкофильтрации через устройство «Лейкосеп»[®] в отношении цитомегаловируса ($n=3$). Через малый макетный образец фильтра пропусклась кровь больных с активной ЦМВ инфекцией (положительный сигнал при NAT-тестировании в крови). До фильтрации содержание ДНК ЦМВ в полимеразной цепной реакции («real time») составляла ≤ 500 ген-экв/мл, после лейкофильтрации – сигнал не обнаружен, что подтверждает приведенные выше литературные данные.

Для решения вопроса о сохранности биологических свойств профильтрованной через «Лейкосеп»[®] плазмы исследовали содержание в ней общего белка и его фракций, а также основные плазменные показатели свертывающей системы крови. В последнем случае лейкофильтрации подвергали плазму не позднее 4 часов после заготовки крови.

Таблица 2 – Содержание белков плазмы (г/л) до и после фильтрования через устройство «Лейкосеп»[®]

Белки и их фракции	Общий белок	Альбумины	Глобулины				А/Г
			α_1	α_2	В	γ	
До фильтрования	57,9 ± 0,81	33,6 ± 0,63	1,6 ± 0,16	4,3 ± 0,21	7,4 ± 0,41	11,0 ± 1,06	1,4 ± 0,08
После фильтрования	57,8 ± 0,96	34,0 ± 0,65	1,3 ± 0,09	4,2 ± 0,28	7,2 ± 0,37	11,1 ± 0,57	1,4 ± 0,06

Как следует из табл. 2, достоверных различий в содержании общего белка и его фракций до и после фильтрования не выявлено.

Таблица 3 – Показатели свертывающей системы плазмы до и после фильтрования через устройство «Лейкосеп»[®]

Показатели свертывания крови	АПТВ, отн. ед.	Ф. VIII, %	Ф. V, %	Фибриноген, г/л
------------------------------	----------------	------------	---------	-----------------

До фильтрации	1,33±0,061	118,1±10,63	63,4±8,86	2,3±0,27
После фильтрации	1,36±0,064	106,9±9,00	59,6±7,57	2,5±0,25

Данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют, что уровень показателей лабильных факторов свертывания в плазме после лейкофильтрации достоверно не отличался от таковых в плазме до фильтрации.

Для повышения безопасности свежезамороженной плазмы и обеспечения реализации приказа МЗ РФ об обязательной лейкофильтрации плазмы при ее карантинизации, в 2007 г., совместно с НТЦ «Мепотекс» и ООО НПП «Экофильтр», разработан отечественный фильтр «Лейкосеп»[®]-Пл, специально предназначенный для лейкодеплеции дозы плазмы. Узел фильтрации имеет уменьшенный объем, что обеспечивает низкий уровень потерь среды – 2,8±0,50%.

Учитывая распространенность в настоящее время двойного плазмафереза (в том числе дискретного), в 2009 г. в РосНИИГТ была проведена работа по разработке оптимальной технологии лейкофильтрации заготовленной этим методом плазмы с помощью нового типа устройства для удаления лейкоцитов из двух доз плазмы одного донора (с аналогичным названием «Лейкосеп»[®]-Пл), имеющего 2 иглы, узел фильтрации, обходные магистрали (для вытеснения остатков плазмы из трубок и фильтрационного узла), 2 контейнера для сбора фильтрованной плазмы. Содержание остаточных лейкоцитов в дозе профильтрованной плазмы составляет в среднем $4,0\pm 0,53 \times 10^4$. Наличие специальных коннекторов для стерильного подсоединения данных устройств к контейнерам с нативной плазмой позволяет хранить безлейкоцитную плазму в виде СЗП и использовать ее для фракционирования. В настоящее время ЗАО «НПП «Интероко» осуществляет промышленный выпуск 2-х видов изделий для лейкодеплеции плазмы.

Кроме того, разработан и с 2008 года производится прикроватный лейкофильтр «Лейкосеп»[®]-Пк, предназначенный для переливания реципиенту ЭМ со сроком хранения не более 5-ти суток.

Для переливания хранившихся более 5-ти суток эритроцитных сред, не подвергшихся при заготовке лейкодеплеции (препятствующей образованию микроагрегатов при хранении), требуется использование прикроватных систем с микрофильтрами. С 2012 года ЗАО «НПП «Интероко» освоил выпуск новых устройств ПК 13-07 с боковой микрофильтрацией и ведется работа по созданию детского варианта устройства с микрофильтром ПК 23-01 для педиатрической практики. Оба устройства

обеспечивают задержку микроагрегатов до 99%. В настоящее время совместно с НТЦ «Мепотекс», НПП «Экофилтър», ООО «ЭФТЭК» в РосНИИГТ ведется работа по созданию более совершенных фильтрующих материалов для микро- и лейкофилтрации, в том числе на основе нановолокон.

Применение метода лейкофилтрации при криоконсервировании эритроцитов с целью карантинизации

Внедрение в практику лейкофилтрации компонентов крови, как было сказано выше, обеспечивает профилактику ряда иммунологических осложнений и переноса лейкоцитассоциированных вирусов. Однако при этом сохраняется риск инфицирования реципиента возбудителями гепатитов В, С, ВИЧ, передающихся с минимальным количеством среды (до 10^{-6} мл), чему способствует сложность диагностики указанных инфекций в серонегативном периоде [14, 28, 29, 30]. Реальной возможностью изменения этой ситуации применительно к эритроцитным средам является их лейкофилтрация при заготовке и карантинизация (по аналогии с плазмой) с повторным обследованием доноров через 6 месяцев (с учетом максимальной продолжительности латентного периода гемотрансмиссивных инфекций). Единственным способом долгосрочного хранения эритроцитов, в том числе и для обеспечения возможности их карантинизации, является криоконсервирование. Размороженная и отмытая эритроцитная масса имеет, кроме того, преимущества перед другими эритроцитными средами, так как в процессе криоконсервирования разрушается большинство лейкоцитов и тромбоцитов, а при отмывании от криопротектора удаляются белки плазмы, антитела, строма старых разрушенных эритроцитов, продукты метаболизма клеток и цитокины, накопившиеся в среде до замораживания, микроагрегаты клеток. Удаление белков плазмы очень важно для профилактики аллергических реакций (тяжелые аллергические реакции составляют до 22,2% среди посттрансфузионных осложнений), а элиминация анти-HLA и гранулоцитспецифичных аллоантител (анти-NB2, анти-NA2, анти-HNA-3a и др.) – для профилактики острого повреждения легких, ассоциированного с трансфузией, и синдрома аллогенной крови [31, 32, 33].

Нами была разработана технология лейкофилтрации через фильтры в основном отечественного производства («Лейкосеп»[®]) с последующим криоконсервированием эритроцитов при умеренно низких температурах ($-38\pm 2^{\circ}\text{C}$) и их карантинизацией [34]. Доказана эффективность лейкодеплеции и сохранность морфофункциональных свойств лейкофилтрированных эритроцитов после их размораживания и отмывания через 6 месяцев

хранения (содержание свободного гемоглобина в готовой к трансфузии взвеси составляет в среднем $0,68 \pm 0,194$ г/л; показатель гематокрита - $35,7 \pm 3,03\%$; содержание АТФ – $4,37 \pm 0,109$ мкМ/г Нв, морфологический индекс – $95,7 \pm 0,77$, содержание осмотически неустойчивых эритроцитов – $1,2 \pm 0,09\%$). Не отмечено достоверных различий между показателями сохранности декриоконсервированных эритроцитов, профильтрованных через отечественное устройство «Лейкосеп»[®] и лейкофильтры Imugard III RC японской фирмы Terumo (табл. 2.1 и 2.2).

Таблица 2.1 – Характеристика взвесей размороженных отмытых эритроцитов (РОЭ) в растворе 8в после хранения при $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 6-ти месяцев

Показатели	РОЭ (контроль) n=14	Лейкофильтрованные РОЭ	
		Лейкосеп (n=20)	Imugard III RC (n=18)
Гематокрит, %	$38,4 \pm 1,59$	$33,8 \pm 4,51^*$	$39,0 \pm 0,79$
Свободный гемоглобин, г/л	$1,05 \pm 0,066$	$0,67 \pm 0,052^*$	$0,74 \pm 0,109^*$
Процент гемолиза	$0,42 \pm 0,049$	$0,28 \pm 0,021^*$	$0,30 \pm 0,053^*$
ОНЭ, %	$1,4 \pm 0,16$	$1,2 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,12$
Морфологический индекс	$92,5 \pm 2,01$	$95,7 \pm 0,77$	$95,8 \pm 0,86$
Содержание АТФ, мкМ/г Нв	$4,04 \pm 0,134$	$4,37 \pm 0,109$	$4,43 \pm 0,142$
Содержание АТФ, % от исходного	$84,3 \pm 2,80$	$90,3 \pm 2,27$	$90,8 \pm 2,91$
Содержание остаточных лейкоцитов в дозе взвеси	$8,3 \pm 1,71 \times 10^6$	$0,7 \pm 0,14 \times 10^{6*}$	$0,6 \pm 0,10 \times 10^{6*}$

Примечание: знаком * обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной серией опытов; знаком • обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной серией опытов..

Таблица 2.2 – Характеристика взвесей размороженных отмытых эритроцитов (РОЭ) в растворе 8в после хранения при $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 7 месяцев

Показатели	РОЭ (контроль) n=14	Лейкофильтрованные РОЭ	
		Лейкосеп (n=17)	Imugard III RC (n=16)
Гематокрит, %	$37,3 \pm 1,12$	$37,9 \pm 1,54$	$32,1 \pm 1,41^*$
Свободный гемоглобин, г/л	$0,94 \pm 0,078$	$0,62 \pm 0,080^*$	$0,64 \pm 0,077^*$
Процент гемолиза	$0,42 \pm 0,056$	$0,28 \pm 0,021^*$	$0,34 \pm 0,064$
ОНЭ, %	$1,4 \pm 0,14$	$1,2 \pm 0,14$	$1,4 \pm 0,08$
Морфологический индекс	$90,9 \pm 0,98$	$94,8 \pm 1,08$	$94,8 \pm 1,31$

Содержание АТФ, мкМ/г Нб	3,98±0,102	4,21±0,155	4,29±0,085
Содержание АТФ, % от исходного	83,1±2,13	87,0±3,23	87,9±1,74
Содержание остаточных лейкоцитов в дозе взвеси	10,0±1,63×10 ⁶	0,5±0,07×10 ⁶ *	0,7±0,13×10 ⁶ *

Примечание: знаком * обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной серией опытов; знаком • обозначено статистически достоверное различие ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной серией опытов..

Всего после различных сроков хранения (от 3-х до 12-ти месяцев) при $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ исследовано 157 образцов лейкофильтрованных размороженных отмытых эритроцитов (ЛРОЭ) – опытные серии и РОЭ (контрольные серии). По ряду показателей сохранности свойств эритроцитов (морфологический индекс, уровень АТФ, степень гемолиза) отмечено положительное влияние лейкоредукции перед криоконсервированием (в том числе, статистически достоверное).

Уровень остаточных лейкоцитов в конечной взвеси лейкофильтрованных эритроцитов ниже иммуногенного (в среднем от $0,7 \times 10^6$ до $0,5 \times 10^6$ в дозе при разных сроках хранения) и более чем на порядок ниже, чем в нефильтрованных.

Таблица 2.3 – Объем взвесей размороженных отмытых эритроцитов в растворе 8в и содержание гемоглобина после хранения при $-38 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 6-7 месяцев

Показатели	РОЭ (контроль) n=28	Лейкофильтрованные РОЭ		
		В среднем (n=71)	«Лейкосеп» (n=37)	Imugard III RC (n=34)
Объем дозы эритроцвзвеси, мл	288,3±7,31	271,6±5,99	273,1±9,80	269,7±4,92
Содержание гемоглобина в дозе, г	43,6±0,74	40,7±0,87	40,3±0,83	41,1±1,68

Средний объем взвеси лейкофильтрованных с помощью 2-х видов устройств декриоконсервированных эритроцитов составляет $271,6 \pm 5,99$ мл, содержание гемоглобина в дозе – $40,7 \pm 0,87$ г, что соответствует стандартам для размороженных отмытых эритроцитов (табл. 2.3).

Достаточное содержание гемоглобина в дозе, сохранность морфофункциональных свойств красных клеток крови свидетельствуют о пригодности данной эритроцитной среды для переливания.

Возможность одновременной карантинизации эритроцитов и плазмы, заготовленных от одного донора при использовании устройства «Лейкосеп»® (что обеспечивает один вызов его для обследования), является существенным организационным и экономическим

преимуществом предлагаемой технологии заготовки лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов.

В режиме пилотного исследования было проведено первоначальное изучение безвредности и клинической эффективности лейкофильтрованных декриоконсервированных эритроцитов. Было перелито 25 доз эритроцитов реципиентам с анемией различного генеза, в том числе пациентам с МДС и большим ХПН, находящимся на гемодиализе. Реципиентам переливалось по 1-2 дозы ЛРОЭ. Ни в одном случае не было отмечено каких-либо посттрансфузионных реакций и осложнений. Средний прирост гемоглобина через 1 сутки после трансфузии двух доз ЛРОЭ составил $19,3 \pm 2,73$ г/л.

Таким образом, лейкофильтрованные карантинизированные размороженные отмытые эритроциты, практически лишенные примесей лейкоцитов и плазмы, являются эффективной гемотрансфузионной средой и их практическое применение по показаниям обеспечит надежную профилактику не только иммунологических осложнений и переноса декретированных гемотрансмиссивных инфекций, но и лейкоцитассоциированных инфекций, на наличие которых не проводится обязательное обследование доноров в России.

Утверждена и издана медицинская технология «Технология заготовки и создания запасов лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов для обеспечения иммунологической и инфекционной безопасности их трансфузий». Разрешение на применение новой медицинской технологии ФС №2011/177 получено 30.06.2011 г.

В двух сериях опытов показана также сохранность морфофункциональных свойств лейкофильтрованных эритроцитов при использовании метода криоконсервирования при ультранизких температурах (-196°C).

Полученные нами данные согласуются с данными американских исследователей (Bandarenko N. et al., 2007), изучавших свойства лейкофильтрованных эритроцитов после хранения при $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ (не в целях карантинизации). Было показано, что содержание гемоглобина (г/доза) после деглицеринизации составило соответственно $40,7 \pm 4,8$ и $43,0 \pm 7,7$ для лейкофильтрованных и нелейкофильтрованных эритроцитов, концентрации АТФ и 2,3-ДФГ, а также рН были несколько выше в серии лейкофильтрованных эритроцитов [35].

Заключение

Внедрение в практику отечественных устройств для удаления лейкоцитов из гемокомпонентов, имеющих стоимость в 4-6 раз ниже зарубежных аналогов, позволит

удовлетворить клинические потребности в обедненных лейкоцитами компонентах крови и существенно снизить риск развития посттрансфузионных реакций и осложнений. Необходимо отметить, что в настоящее время из имеющихся на российском рынке лейкофильтрующих устройств лишь вышеописанные изделия производства ЗАО «НПП «Интероко» могут считаться полностью изготовленными в России. В других системах российской сборки используются узлы фильтрации зарубежного производства.

Сочетание методов лейкофильтрации, криоконсервирования и карантинизации дает возможность получить максимально на данный момент безопасную как в иммунологическом, так и в эпидемиологическом плане эритроцитную среду (пока не разработаны эффективные методы вирусинактивации красных клеток крови).

Лейкофильтрованные карантинизированные эритроциты представляются оптимальным средством гемоконпонентной терапии для пациентов, получающих множественные трансфузии, в педиатрической и акушерской практике, у больных с отягощенным аллергологическим и иммунологическим анамнезом. Особенно актуально данное средство у онкогематологических больных, риск инфицирования которых гемотрансмиссивными инфекциями очень высок [36, 37, 38].

Литература

1. Aye M.T., Palmer D.S., Giulivi A., Hashemi S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage // *Transfusion*. – 1995. – V.35, № 2. – P.117 – 124.
2. Heddle N.M. Pathophysiology of febrile nonhemolytic transfusion reactions // *Curr. Opin. Hematol.* – 1999. – V.6, №6. – P. 420 – 426.
3. King K.E., Shirey R.S., Thomas S.K. et al. Universal leukoreduction decreases the incidence of febrile nonhemolytic transfusion reactions to RBCs // *Transfusion* –2004. – V44, №1 – P. 25-29.
4. Pruss A., Kalus U., Radtke H. et al. Universal leukodepletion of blood components results in a significant reduction of febrile nonhemolytic but not allergic transfusion reactions // *Transfus. Apher. Sci.* – 2004. – 30, №1. – P. 41-46.
5. Пугина Н.В., Вильянинов В.Н., Романенко С.М., Игнатович Г.П. Лейкофильтрация и качество эритроцитосодержащих гемоконпонентов // *Трансфузиология*. – 2009. – Т.10, №1-2 – С. 53-54.
6. Шевченко Ю.Л., Шабалин В.Н. и др. Руководство по общей и клинической

- трансфузиологии. - СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2003. - 608 с.
7. Никитин И.К., Козинец Г.И. Кровь, компоненты крови: хранение, фракционирование, качество и стандарты // Гематол. и трансфузиол. – 2002. – Т.47, № 4. – С. 36 – 39.
 8. Drakos S.G., Stringham J.C., Long J.W. et al. Prevalence and risks of allosensitization in HeartMate left ventricular assist device recipients: the impact of leukofiltered cellular blood product transfusions // Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2007. – V.133, №6. – P. 1612-1619.
 9. Williamson L.M., Stainsby D., Jones H. et al. The impact of universal leukodepletion of the blood supply on hemovigilance reports of posttransfusion purpura and transfusion-associated graft-versus-host disease // Transfusion – 2007. – V.47, №8 – P. 1455-1467.
 10. Жибурт Е.Б., Шестаков Е.А., Коднев А.Т. и др. Новое в трансфузиологии (на XIX региональном конгрессе международного общества переливания крови) // Трансфузиология. – 2009. – Т.10, №3-4 – С. 64-92.
 11. Van Hust M., Bilgin Y.M., Watering L.M. Cost-effectiveness of leucocyte-depleted erythrocyte transfusion in cardiac valve surgery // Transfusion Medicine. – 2005. – V.15, №3. – P. 209.
 12. Blumberg N., Heal J.M., Gettings K.F. An association between decreased cardiopulmonary complications (transfusion-related acute lung injury and transfusion-associated circulatory overload) and implementation of universal leukoreduction of blood transfusions // Transfusion. – 2010. – V. 50, N 12. – P. 2738–2744.
 13. Blumberg N., Lynn Fine, Gettings K.F. et al. Decreased sepsis related to indwelling venous access devices coincident with implementation of universal leukoreduction of blood transfusions // Transfusion. – 2005. – V. 45, N 10. – P. 1632-1639.
 14. Русанов В.М. Вирусная безопасность донорской плазмы // Вестник службы крови России – 2008. - №2 – С. 34-37.
 15. Спичак И.И., Пешикова М.В., Казачкова А.Е., Жуковская Е.В. Применение фармакоэкономического анализа для оценки эффективности затрат на повышение биобезопасности гемотрансфузионных средств с различной контаминацией лейкоцитами // Вестник службы крови России – 2010. . – №1. – С. 27-32.
 16. Dumont L.J., Luka J., Vandenbrocke T. et al. The effect of leukocyte-reduction method on the amount of human cytomegalovirus in blood products: a comparison of apheresis and filtration // Blood – 2001. – V.97, N11 – P. 3640-3647.
 17. Qu L., Xu S., Rowe D., Triulzi D. Efficacy of Epstein-Barr virus removal by leukoreduction of red blood cells // Transfusion – 2005. – V45, №4 – P. 591-595.

18. Visconti M.R., Pennington J., Garner S.F. et al. Assessment of removal of human cytomegalovirus from blood components by leukocyte depletion filters using real-time quantitative PCR // *Blood* – 2004. – V.103 – P. 1137-1139.
19. Wu Y., Zou S., Cable R. et al. Direct assessment of cytomegalovirus transfusion-transmitted risks after universal leukoreduction // *Transfusion* – 2010. – V.50, №4 – P. 776-786.
20. Cardo L.J., Salata J., Harman R. et al. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside // *Transfusion* – 2006. – V.46, №6 – P. 896-902.
21. Cardo L.J., Asher L. Electron micrographic study of the removal of *Trypanosoma cruzi* from blood products by leukoreduction filters // *Transfusion* – 2006. – V.46, №7 – P.1067-1068.
22. Cardo L., Salata J., Wilder D. Removal of *Plasmodium falciparum* – infected red blood cells from whole blood by leukoreduction filters // *Transfusion* – 2009. – V.49, №.3 – P. 337-346.
23. Kim D.M., Brecher M.E., Bland L.A. et al. Prestorage removal of *Yersinia enterocolitica* from red cells with white cell-reduction filters // *Transfusion* – 1992. – V.32, №7. – P. 658-662
24. Yamaguchi H., Yamada M., Uruma T. et al. Prevalence of viable *Chlamydia pneumoniae* in peripheral blood mononuclear cells of healthy blood donors // *Transfusion* – 2004. – V.44, №7 – P. 1072-1078.
25. Collaerts A.J., Gielis M.L., Sprengers E.D., Muylle L. The mechanism of white cell reduction by synthetic fiber cell filters // *Transfusion*. – 1993. – V. 33, N 2. – P. 134 – 138.
26. Brownlee L., Wardrop K.J., Sellon R.K., Meyers K.M. Use of a prestorage leukoreduction filter effectively removes leukocytes from canine whole blood while preserving red blood cell viability // *J. Vet. Intern Med.* – 2000 – V.14, N4 – P. 412-417.
27. Мельникова В.Н., Селиванов Е.А., Кирьянова Г.Ю. и др. Метод заготовки лейкофильтрованных отмытых эритроцитов // *Трансфузиология*. – 2010. – Т.11, №3 – С. 4-11 .
28. Куликов С.М., Гармаева Т.Ц., Зингерман Б.В. и др. Вирусная безопасность гемотрансфузий и методы ее оценки // *Гематол. и трансфузиол.* – 2008.– Т. 53, № 4 – С.3-5.
29. Дашкова Н.Г., Расницын С.П., Рагимов А.А. и др. Частота выявления маркеров гемотрансмиссивных инфекций у доноров // *Вестник службы крови России* – 2005. - №3 – С. 17-19.

30. Ярославцева Н.Г., Грумбкова Л.О., Туполева Т.А и др. Вирусная безопасность гемотрансфузий: обеспечивают ли ее принятые лабораторные методы выбраковки донорской крови по гепатитам В и С // Гематол. и трансфузиол. – 2006. – Т. 51, №2 – С. 22-26.
31. Лазаренко М.И., Чечеткин А.В., Слащев В.В. и др. Некоторые вопросы безопасности доноров и реципиентов // Гематол. и трансфузиол. – 2007. – Т. 52, №3 – С. 52-54.
32. Chapman C.E., Stainsby D., Jones H. et al. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. // Transfusion. –2009. – V49, №3 – P. 440-452.
33. Muniz M., Sheldon S., Schuller R.M. et al. Patient-specific transfusion-related acute lung injury // Vox Sanquinis – 2008. – 94 – P.70-73.
34. Мельникова В.Н., Селиванов Е.А., Кирьянова Г.Ю. и др. Значение лейкофильтрации при криоконсервировании эритроцитов с целью их карантинизации // Вестник службы крови России. – 2010. – №4. – С. 3-7.
35. Vandarenko N., Cancelas J., Snyder E.L. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution (AS)-5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system // Transfusion –2007. – V47, №4 – P. 680-686.
36. Васкина Е.А., Демьянова В.Т., Загоскина Т.П. Частота вирусных гепатитов у детей с онкогематологическими заболеваниями // Вестник гематологии – 2007– Т.3, №2– С.11.
37. Гармаева Т.Ц., Куликов С.М., Карякин А.В. и др. Мониторирование факторов риска и индикаторов инфицированности вирусами гепатитов В и С гематологических больных // Гематол. и трансфузиол. – 2006. – Т. 51, № 1 – С. 23-27.
38. Февралева И.С., Глинщикова О.А., Макарик Т.В., Судариков А.Б. Мультиплексная диагностика вирусов гепатитов В, С и парвовируса В19 у больных, получающих множественные гемотрансфузии // Гематол. и трансфузиол. – 2008. – Т. 53, № 4 – С. 54-56