

15. Pappas P.G., Rotstein C.M., Betts R.F., Nucci M., Talwar D., De Waele J.J., et al. Micafungin versus caspofungin for treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45(7): 883–93. doi: 10.1086/520980.
16. Tamura K., Urabe A., Yoshida M., Kanamaru A., Kadera Y., Okamoto S., et al. Efficacy and safety of micafungin, an echinocandin antifungal agent, on invasive fungal infections in patients with hematological disorders. *Leuk. Lymphoma*. 2009; 50(1): 92–100. doi: 10.1080/10428190802635500.
17. Kubiak D.W., Bryar J.M., McDonnell M.A., Delgado-Flores J.O. Mui E., Baden L.R. Caspofungin vs micafungin for empirical therapy in adult neutropenic patients with persistent fever: a retrospective analysis. Proc. 48th Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother. Washington, 25–28 Oct. 2008. Available at: <http://www.abstractsonline.com/viewer/viewAbstract.asp?CKey={EF0CE200-93C4-4625-8CDE-62E78BC17090}&MKey={26DFAE32-3D6D-446F-9AE5-B759FE42C683}&AKey={B156596F-4F2B-4B7B-9988-53EF0A523ACC}&SKey={41A9FE49-0419-4B58-A874-6663711FCEBB}> (accessed 24 Nov 2017)
18. Schneeweiss S., Carver P.L., Datta K., Galar A., Johnson M.D., Johnson M.G., et al. Short-term risk of liver and renal injury in hospitalized patients using micafungin: a multicentre cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(10): 2938–44. doi:10.1093/jac/dkw225.
19. Huang X., Chen H., Han M., Zou P., Wu D., Lai Y., et al. Multicenter, randomized, open-label study comparing the efficacy and safety of micafungin versus itraconazole for prophylaxis of invasive fungal infections in patients undergoing hematopoietic stem cell transplant. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2012; 18(10): 1509–16. doi:10.1016/j.bbmt.2012.03.014.
20. Shibata Y., Hagihara M., Kato H., Kawasumi N., Hirai J., Nishiyama N., et al. Caspofungin versus micafungin in the incidence of hepatotoxicity in patients with normal to moderate liver failure. *J. Infect. Chemother.* 2017; 23(6): 349–53. doi: 10.1016/j.jiac.2017.02.008.
21. Luque S., Campillo N., Alvarez-Lerma F., Ferrandez O., Horcajada J.P., Grau S. Pharmacokinetics of micafungin in patients with pre-existing liver dysfunction: A safe option for treating invasive fungal infections. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2016; 34(10): 652–4. doi: 10.1016/j.eimc.2015.02.021.

Поступила 24.11.17

Принята к печати 29.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.38:612.111.7]-015.4

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 И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ ОБЛУЧЕНИЕ СПЕКТРА А

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
125167, г. Москва, Россия

Представлены результаты по изучению влияния технологии редукции патогенов амотосален и ультрафиолетовое облучение спектра А на маркеры активации донорских тромбоцитов – антиген CD62P, связывание с антителом PAC-1 под действием аденозиндифосфата (АДФ) – при суспендировании тромбоцитов в цельной плазме донора и в добавочном растворе SSP⁺, замещающем 70% донорской плазмы, при хранении до 7 сут. Во всех образцах концентратов тромбоцитов в процессе хранения наблюдалась тенденция к увеличению доли спонтанно активированных тромбоцитов и уменьшению доли тромбоцитов, способных к специфической активации под действием агониста АДФ. Проведение патогенредукции не повлияло на способность к специфической активации тромбоцитов, но привело к увеличению доли спонтанно активированных тромбоцитов. Замещение плазмы раствором SSP⁺ привело к увеличению доли спонтанно активированных тромбоцитов, но при длительном хранении (к 7-му дню) способствовало сохранению доли функционально активных тромбоцитов.

Ключевые слова: концентрат тромбоцитов; редукция патогенов; технология амотосален+УФА; добавочный раствор SSP⁺; P-селектин; антиген CD62P; антитела PAC-1.

Для цитирования: 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 и ультрафиолетовое облучение спектра А. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(4): 197–203. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-197-203>

Azimova M.Kh., Gaponova T.V., Galstyan G.M., Galtseva I.V., Davydova Yu.O., Kapranov N.M., Savchenko V.G.

CHANGES OF PLATELET ACTIVATION MARKERS IN DONOR PLATELETS CONCENTRATES DURING THE STORAGE AFTER THE INACTIVATION OF PATHOGENS BY AMOTOSALEN AND ULTRAVIOLET A RADIATION TECHNOLOGY

National Medical Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

Pathogen inactivation treatment of platelet concentrates improves the transfusion safety. The influence of the pathogen inactivation on the platelet activation remained unclear. The aim of the study was to evaluate the changes of the platelet activation markers in donor platelets concentrates during the storage after the inactivation of pathogens by amotosalen and ultraviolet A. By flow cytometry CD62P (P-Selectin) and activated GPIIb/IIIa surface expression were estimated with a mouse-anti-human IgG1 CD62-PE antibodies and mouse-anti-human GPIIb/IIIa-FITC (PAC-1) antibodies. In platelet concentrates during the storage the fraction of the spontaneously activated platelets increased and fraction of the platelets capable of specific activation under the action of the ADP agonist decreased. The pathogen reduction did not affect the ability of platelets to specific activity, but led to an increase in the fraction of the spontaneously

activated platelets. Replacement of plasma with a solution SSP⁺ led to the increase in the proportion of spontaneously activated platelets, but during prolonged storage has contributed to the preservation of the fraction of functionally active platelets.

Key words: platelet concentrate; reduction of pathogens; technology amotosalen + UVA; platelet additive solution (pas); pH; P-selectin; CD62P antigen; PAC-1 antibodies.

For citations: Azimova M.Kh., Gaponova T.V., Galstyan G.M., Galtseva I.V., Davydova Yu.O., Kapranov N.M., Savchenko V.G. Changes of platelet activation markers in donor platelets concentrates during the storage after the inactivation of pathogens by amotosalen and ultraviolet A radiation technology. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i Transfusiologya)*. 2017; 62(4): 197-203. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-197-203>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 26 Sept 2017

Accepted 29 Dec 2017

Концентрат тромбоцитов (КТ) используется для коррекции тромбоцитопении [1]. КТ является потенциально наиболее опасной трансфузионной средой – с одной стороны, из-за короткого срока хранения, с другой стороны, из-за хранения при комнатной температуре, что делает невозможной карантинизацию этого компонента крови и не позволяет исключить рост микроорганизмов в случае его контаминации. Дополнительную опасность представляет собой содержание в КТ донорской плазмы, которая может быть не только источником гемотрансмиссивных инфекций, но и причиной аллергических реакций, активации системы комплемента, гемолиза и др. [2]. Для повышения безопасности трансфузий в последние годы применяется технология редукции патогенов в концентрате донорских тромбоцитов [3]. Однако вопрос сохранения функциональной активности тромбоцитов после проведения редукции патогенов остается открытым. В литературе мало работ [4–6], посвященных влиянию технологии инактивации патогенов на функциональную активность тромбоцитов при разных сроках хранения. Ранее нами и другими исследователями были описаны преимущества применения аддитивных растворов, которые лучше сохраняют целостность мембраны тромбоцитов и стабильно поддерживают уровень pH в течение всего срока хранения, уменьшают скорость потребления глюкозы и накопление молочной кислоты [7–11]. В настоящей работе оценена активация тромбоцитов в КТ в зависимости от среды суспендирования, инактивации патогенов и сроков хранения.

Цель работы – сравнить функциональную активность тромбоцитов, суспендированных в плазме и в добавочном растворе, подвергшихся и не подвергшихся инактивации патогенов, при хранении от 1 до 7 дней.

Материалы и методы

Сбор тромбоцитов проводили на сепараторе клеток Trima Accel (“Cardian”, США) в соответствии с инструкцией изготовителя. КТ, содержащие 8×10^{11} /клеток, получали в объеме

Для корреспонденции:

Азимова Мухайёхон Ходжиевна, врач-трансфузиолог отделения клинической трансфузиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр Гематологии» Минздрава России, 126167, г. Москва, Россия. E-mail: maya-azim@mail.ru.

For correspondence:

Azimova Mukhaytkhon Kh., physician of the Department of clinical Transfusiology, National Medical Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian federation. E-mail: maya-azim@mail.ru.

Information about authors:

Azimova M.H., <http://orcid.org/0000-0003-4453-7187>;
Gaponova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-9684-5045>;
Galstyan G.M., <http://orcid.org/0000-00031-8818-8949>;
Galtseva I.V., <http://orcid.org/0000-0002-8490-6066>;
Davydova Yu.O., <http://orcid.org/0000-0001-5932-0285>;
Kapranov N.M., <http://orcid.org/0000-0002-6512-910x>;
Savchenko V.G., <http://orcid.org/0000-0001-8188-5557>.

520 мл и суспендировали либо в 100% плазме донора (КТ_{плазма}, $n = 25$), либо в суспензии, состоящей из 70% добавочного раствора и 30% донорской плазмы (КТ_{ssp+}, $n = 24$). В качестве добавочного раствора применяли SSP⁺, который добавляли к гиперконцентрированному КТ в расчете 65 мл на $0,6 \times 10^{11}$ клеток. Для этого использовали устройство для стерильного запаивания трубок пластиковых гемоконтейнеров TSCD-II (“Terumo”, США). Суспензия была подготовлена из расчета 364 мл (70%) раствора SSP⁺ на 156 мл (30%) донорской плазмы. От исходных 2 типов КТ в день заготовки отделяли в полимерные контейнеры по 100 мл КТ и использовали их в качестве контроля (КТ_{плазма} и КТ_{ssp+}). На следующий день после получения отрицательных результатов тестов на гемотрансмиссивные инфекции проводили обработку оставшихся 420 мл КТ по технологии Интерсепт, в результате чего получали два вида патогенредуцированных КТ (ПРКТ) – ПРКТ_{плазма} и ПРКТ_{ssp+} (рис. 1). Из каждого вида ПРКТ отделяли в полимерные контейнеры по 100 мл для исследований. Оставшиеся 320 мл ПРКТ обоих видов выдавали реципиентам для трансфузий (см. рис. 1). Все КТ подвергали лейкоредукции с помощью встроенной камеры для лейкоредукции LRC (“Terumo”, США) и проводили стандартный контроль на AB0, CcEe, Келл, RhD, анти-ВИЧ 1 и 2, HBsAg, анти-HBs, анти-HCV, DNA HBV, RNA HCV и RNA антитела к ВИЧ. Помимо этого, проводили контроль всех заготовленных КТ на соответствие критериям качества, предусмотренным техническим регламентом [12]. Редукцию патогенов КТ по технологии Интерсепт проводили с использованием амотосалена и ультрафиолетового облучения лучами спектра А (УФА) (“Blood System”) [13]. Данный метод включает в себя три этапа. На первом этапе контейнер с КТ соединяли с одноразовым комплектом INTERCEPT для редукции патогенов, в который добавляли амотосален до концентрации 150 мкМ. Следующий этап – облучение УФА интенсивностью 3 Дж/см² с помощью аппарата INT100 (облучатель INTERCEPT, Cerus Corporation, “Concord”, США). После УФА-облучения проводили 3-й этап – адсорбцию остаточного амотосалена и продуктов фотораспада с помощью адсорбирующего элемента САД. Контейнер КТ с адсорбирующим элементом помещали в тромбомиксер в режиме постоянного встряхивания при температуре 20–24°C на время, указанное производителем, с учетом среды суспендирования [13]. Продолжительность инкубации с адсорбентом САД составила 16 ч в соответствии с инструкцией производителя. Спонтанную активацию тромбоцитов в КТ оценивали по уровню экспрессии Р-селектина (CD62P) на поверхности мембраны тромбоцитов. Помимо спонтанной активации определяли долю тромбоцитов, связавшихся с антителом PAC-1 под действием агониста – аденозиндифосфата (АДФ). Антитело PAC-1 взаимодействуют только со специфически активированными тромбоцитами. Агрегация тромбоцитов возможна при наличии рецепторов к фибриногену, который содержится в гликопротеине GPIIb-IIIa. Моноклональные антитела PAC-1 специфичны именно к конформационно-измененному комплексу GPIIb-IIIa и распознают эпитоп, расположенный поблизости от фибриноген-связывающего рецептора [14].

CD62P и PAC-1 исследовали методом проточной цитофлюориметрии. Для выполнения проточной цитофлюориметрии образцы КТ разводили буфером CellWash (“BD Biosciences”, США) до концентрации $2-3 \times 10^7$ клеток/мл. Для активации тромбоцитов к разведенному буфером КТ добавляли раствор

хлорида кальция до конечной концентрации 2,5 мМ. Эти пробы использовали для оценки спонтанной активации тромбоцитов. Для оценки специфической активации тромбоцитов к полученным образцам добавляли АДФ («РЕНАМ», Россия) в концентрации 20 мкМ и инкубировали в течение 2 мин, затем добавляли моноклональные антитела Anti-CD62P PE («BD Pharmingen», США) и PAC-1 FITC («BD Biosciences», США) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 6 мин. Цитометрический анализ проводили с помощью проточного цитофлюориметра BD FACSCanto II («BD Biosciences», США). Детекцию тромбоцитов выполняли по показателям бокового и прямого светорассеяния. Далее оценивали долю CD62P- и PAC-1-положительных тромбоцитов в пробе без добавления специфического активатора (спонтанно активированные тромбоциты, экспрессирующие антиген CD62P) и в пробе после активации с помощью АДФ (функционально активные тромбоциты, с которыми антитела PAC-1 связывались после специфической активации агонистом АДФ). Пример стратегии гейтирования представлен на рис. 2.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета GraphPad Prism 6.0.1. Графические данные представлены в виде «боксов с усами», на которых обозначены минимальное и максимальное значения, медиана, среднее значение, нижний и верхний квартили (25 процентиль и 75 процентиль соответственно). Данные в тексте представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего. Статистическая значимость принята $p = 0,05$.

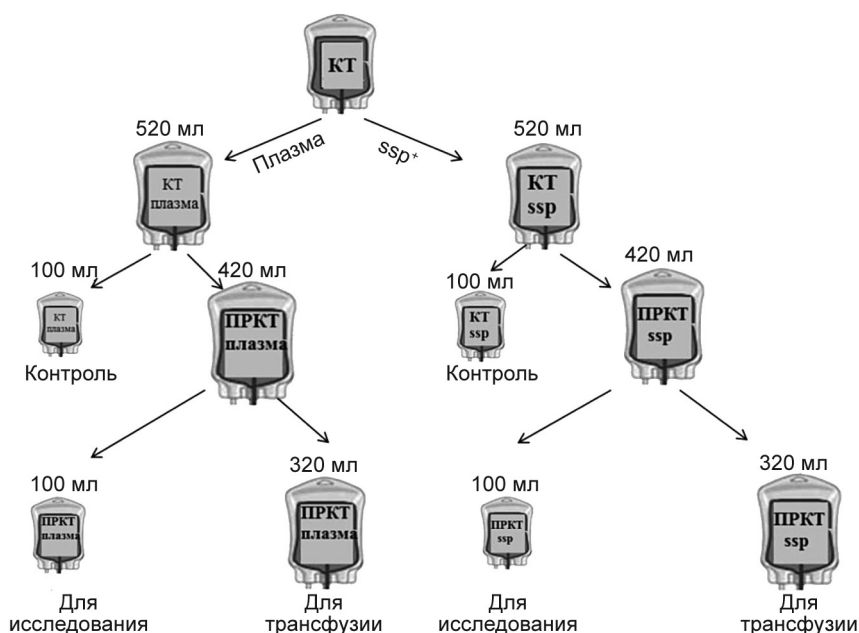


Рис. 1. Схема отделения образцов КТ для исследования.

Перед проверкой различий средних значений выборку проводили тест Шапиро-Уилка для определения нормального распределения (отличными от нормального считали распределения при уровне значимости $p < 0,05$). Для нормальных распределений различия в средних двух несвязанных выборок определяли с помощью непарного t -критерия Стьюдента, для выборок с ненормальным распределением различия в средних двух

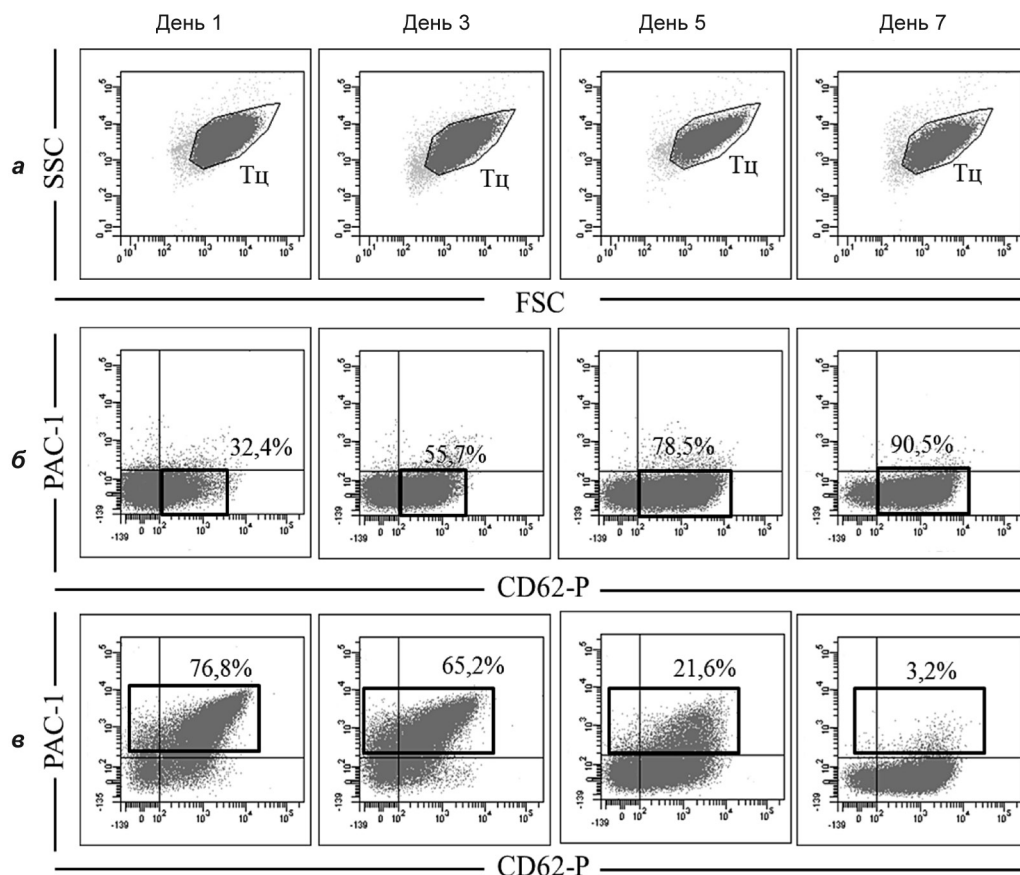


Рис. 2. Стратегия гейтирования тромбоцитов:

а – выделение тромбоцитов по показателям прямого и бокового светорассеяния; б – спонтанная активация тромбоцитов: определяется доля CD62P-положительных тромбоцитов в пробах без добавления АДФ; в – специфическая активация тромбоцитов после добавления агониста АДФ: определяется доля PAC-1⁺/CD62P⁺-тромбоцитов.

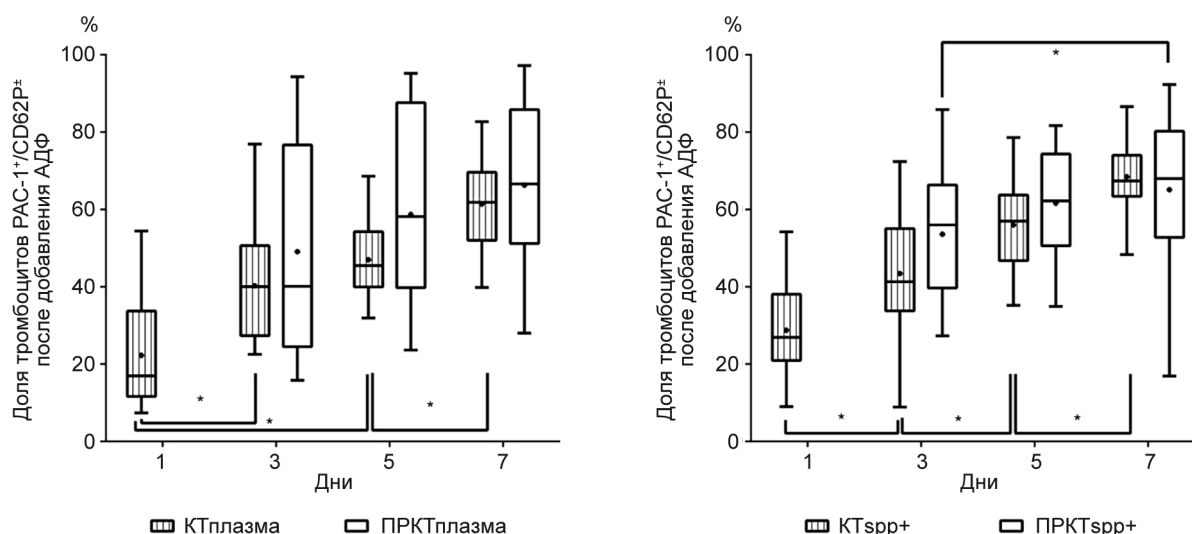


Рис. 3. Доля тромбоцитов, спонтанно экспрессирующих антиген CD62P, в зависимости от сроков хранения во всех исследуемых образцах КТ.

* – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

несвязанных выборок определяли с помощью непараметрического *U*-теста Манна–Уитни. Множественные сравнения проводили с помощью теста ANOVA. Значимыми признавали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние сроков хранения на функции заготовленных тромбоцитов

В день заготовки КТ_{плазма} доля спонтанно активированных тромбоцитов составила $22,3 \pm 3,5$ %. В процессе хранения КТ, суспендированных в плазме, значимо ($p < 0,05$) увеличивалась доля спонтанно активированных тромбоцитов, достигнув максимального значения к 7-м суткам хранения ($61,4 \pm 2,6$ %), т.е. через неделю хранения более половины тромбоцитов в заготовленном КТ были спонтанно активированы (рис. 3; таблица). В ПРКТ_{плазма} с первой точки исследования (3-и сутки) и на протяжении всего периода хранения (на 5-е, 7-е сутки) доля спонтанно активированных тромбоцитов статистически значимо не менялась (см. рис. 3), несмотря на то, что в КТ_{плазма} (исходном компоненте, из которого был изготовлен ПРКТ_{плазма}) данный параметр был уже повышен и к 3-м суткам хранения достигал $40,2 \pm 3,1$ %.

Функциональная активность тромбоцитов при разных сроках хранения

КТ	Дни хранения			
	1-й	3-й	5-й	7-й
<i>Доля спонтанно активированных тромбоцитов, %</i>				
КТ _{плазма}	$22,3 \pm 3,5$	$40,2 \pm 3,1$	$47,0 \pm 2,4$	$61,4 \pm 2,6$
КТ _{ssp+}	$28,7 \pm 2,3^*$	$43,4 \pm 3,1$	$56,0 \pm 2,2^*$	$68,5 \pm 1,9^*$
ПРКТ _{плазма}	–	$49,1 \pm 6,6$	$58,7 \pm 6,2$	$66,3 \pm 5,3$
ПРКТ _{ssp+}	–	$53,6 \pm 3,3$	$61,7 \pm 2,7$	$65,1 \pm 3,6$
<i>Доля АДФ-активированных тромбоцитов, %</i>				
КТ _{плазма}	$65,0 \pm 6,0$	$35,1 \pm 4,0$	$27,5 \pm 2,9$	$12,0 \pm 2,6$
КТ _{ssp+}	$49,0 \pm 5,9$	$28,7 \pm 4,1$	$21,0 \pm 2,2^*$	$17,7 \pm 1,9^*$
ПРКТ _{плазма}	–	$36,3 \pm 5,2$	$27,2 \pm 5,3$	$8,1 \pm 2,3$
ПРКТ _{ssp+}	–	$26,4 \pm 4,3$	$21,4 \pm 2,7$	$18,8 \pm 2,8^{**}$

Примечание. Статистически значимые различия $p < 0,05$:
* – между КТ_{плазма} и КТ_{ssp+}; ** – между ПРКТ_{плазма} и ПРКТ_{ssp+}.

В то же время функция тромбоцитов ухудшалась по мере хранения. В КТ_{плазма} значимо уменьшалась доля тромбоцитов, способных отвечать на стимуляцию АДФ, через 3, 5 и 7 сут ($p < 0,05$) (см. рис. 3, таблицу). В ПРКТ_{плазма} доля тромбоцитов, отвечающих на стимуляцию АДФ, с 3-х по 7-е сутки хранения также значимо снижалась. Аналогичные изменения наблюдали и в тромбоцитах, суспендированных в добавочном растворе. В день заготовки КТ_{ssp+} доля спонтанно активированных тромбоцитов составила $28,7 \pm 2,3$ % и при хранении статистически значимо увеличилась. В ПРКТ_{ssp+} значимое увеличение доли спонтанно активированных тромбоцитов выявлено между 3-ми и 7-ми сутками хранения. Доля тромбоцитов, отвечающих на стимуляцию АДФ, значимо уменьшалась на протяжении 7 дней хранения КТ_{ssp+}. При хранении доля стимулированных АДФ тромбоцитов в ПРКТ_{ssp+} значимо не менялась (см. рис. 3; таблицу).

Влияние среды заготовки на функции заготовленных тромбоцитов в процессе хранения

Еще одной задачей работы было сравнить функцию тромбоцитов в зависимости от среды, в которой они были суспендированы.

С первого дня заготовки и на всех сроках хранения до 7-х суток (за исключением 3-х суток) доля спонтанно активированных тромбоцитов в КТ_{плазма} была значимо ниже, чем в КТ_{ssp+} ($p < 0,05$). Доля АДФ-активированных тромбоцитов была одинаковой в первые 3 дня, однако на 5-е сутки их доля была больше в КТ_{плазма}, чем в КТ_{ssp+}, а на 7-е сутки доля АДФ-активированных тромбоцитов стала больше в КТ_{ssp+}, чем в КТ_{плазма}.

После проведения редукции патогенов доля спонтанно активированных тромбоцитов в процессе хранения в ПРКТ_{плазма} и ПРКТ_{ssp+} значимо не различалась. Доля тромбоцитов, отвечающих на стимуляцию АДФ, на 3-и и 5-е сутки также значимо не различалась в ПРКТ_{плазма} и ПРКТ_{ssp+}, однако на 7-е сутки их доля в ПРКТ_{плазма} была значимо меньше, чем в ПРКТ_{ssp+}.

Влияние технологии редукции патогенов на функции заготовленных тромбоцитов в процессе хранения

Не выявлено статистически значимых различий между долями спонтанно активированных тромбоцитов и тромбоцитов, активированных АДФ, между ПРКТ и КТ на протяжении всего срока хранения за исключением

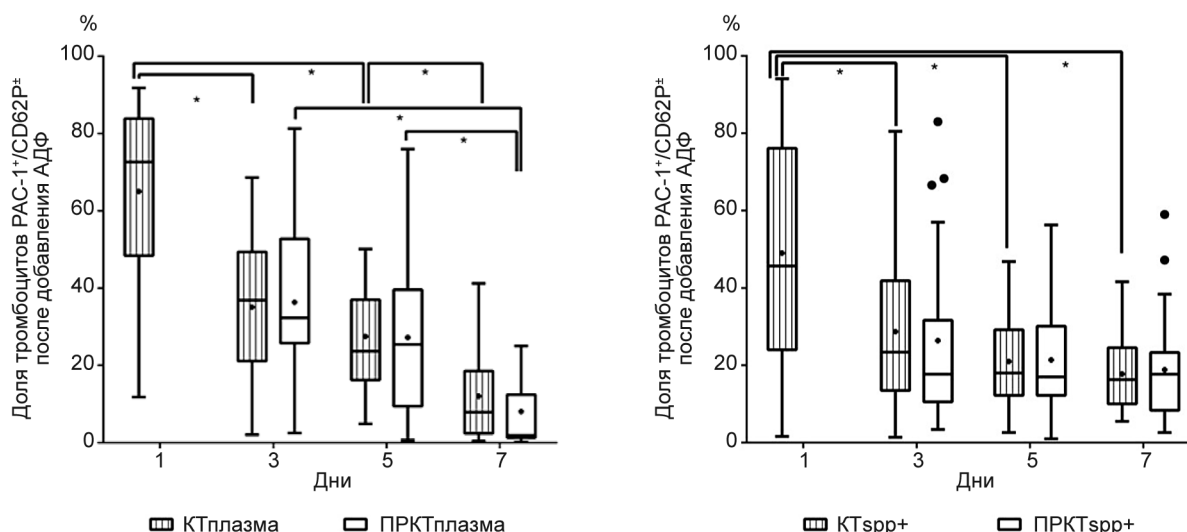


Рис. 4. Доля PAC-1⁺/CD62P⁺-тромбоцитов после добавления АДФ в зависимости от сроков хранения во всех исследуемых образцах. * – различия статистически значимы ($p < 0,05$).

доли спонтанно активированных тромбоцитов в добавочном растворе на 3-и сутки, т.е. в сутки, когда они были заготовлены. В день редукции патогенов доля спонтанно активированных тромбоцитов в ПРКТ_{спп+} была значимо больше, чем в КТ_{спп+} ($p < 0,05$). Однако при дальнейшем хранении эти различия не наблюдались (см. таблицу).

Обсуждение

Тромбоциты в КТ в процессе сбора, заготовки и хранения претерпевают целый ряд изменений, обозначаемых как «повреждение тромбоцитов при хранении» (platelet storage lesions) [15, 16]. При этом в тромбоцитах происходит ослабление экспрессии гликопротеина (ГП) 1b-IX-V, конформационные изменения комплекса IIb-IIIa, ответственного за связь с фибриногеном. Активация внутриклеточной сигнальной системы приводит к высвобождению биологически активных веществ, в частности, к дегрануляции α -гранул с высвобождением Р-селектина (CD62P), который транслоцируется к поверхности активированной клетки. Антиген CD62P относят к семейству селектинов. Он опосредует адгезию активированных тромбоцитов и в состоянии покоя находится на внутренней поверхности мембраны гранул, а при активации обнаруживается на поверхности активированных тромбоцитов [16]. Обнаружение данного антигена на поверхности неактивированных тромбоцитов является свидетельством их спонтанной активации. В результате спонтанной активации дегранулированные тромбоциты могут явиться причиной неэффективности трансфузии КТ [17]. Показано, что чем больше экспрессия Р-селектина в КТ, оцененная по уровню альфа-гранулярного мембранного протеина 140, тем меньше прирост тромбоцитов после трансфузии у реципиента [18]. Поэтому в процессе изготовления и хранения КТ следует стараться минимизировать спонтанную активацию тромбоцитов [2] путем уменьшения срока хранения КТ, подбора среды суспендирования для тромбоцитов и др.

В данной работе с увеличением срока хранения увеличивалась экспрессия Р-селектина прежде всего в КТ, не подвергавшихся редукции патогенов (как в КТ_{плазма}, так и в КТ_{спп+}). В КТ, суспендированных в аналогичных средах, но подвергшихся редукции патогенов (ПРКТ_{плазма} и ПРКТ_{спп+}), не отмечалось значимого увеличения экспрессии CD62P (только в ПРКТ_{спп+} с 3-х на 7-е сутки). При сравнении между собой патогенредуцированных и непатогенредуци-

рованных КТ, суспендированных в аналогичных средах, мы не выявили значимых различий доли спонтанно активированных и АДФ-активированных тромбоцитов. Таким образом, редукция патогенов в нашем исследовании препятствовала спонтанной активации тромбоцитов в процессе хранения. Эти данные соответствуют результатам Р. Sandgren и В. Diedrich [6], которые не выявили значимого увеличения экспрессии CD61 (маркера активации) и CD42 (маркера адгезии) при редукции патогенов по технологии амотосален + УФА ни в процессе хранения в течение 7 суток, ни при сравнении с КТ, не подвергавшимися редукции патогенов. Эти данные противостоят результатам О.В. Карповой [24], согласно которой при сравнительной оценке КТ, обработанных по технологии рибофлавин + УФВ, спонтанная активация тромбоцитов, заготовленных в плазме, увеличилась. Полученные разногласия можно объяснить различиями в технологии редукции патогенов.

М. Abonnenc и соавт. [19] изучали влияние метода редукции патогенов на функцию тромбоцитов. Они показали, что при инактивации патогенов амотосаленом + УФА, рибофлавином + УФВ или только УФВ наибольшую экспрессию Р-селектина (CD62P) вызывала обработка рибофлавином + УФВ. При обработке амотосаленом выявлялся тот же профиль спонтанной активации тромбоцитов, что и в КТ, не подвергавшихся редукции патогенов, в то время как обработанные рибофлавином тромбоциты показали значительно большее усиление экспрессии Р-селектина, чем необработанные тромбоциты. Авторы [19] объяснили полученные результаты различным влиянием технологий патогенредукции на функцию тромбоцитов: технология амотосален + УФА действует на белки, ответственные за активацию и агрегацию тромбоцитов, в то время как обработка рибофлавином + УФВ приводит к изменению формы тромбоцитов, влияя на актин-полимеризацию, организацию цитоскелета [19].

Полученные данные позволяют шире использовать технологию редукции патогенов в КТ, она позволяет увеличить срок хранения тромбоцитов до 7 сут, исключает необходимость их γ -облучения и обеспечивает как иммунологическую, так и инфекционную безопасность трансфузий КТ [20, 21].

Среда суспендирования, в которой хранятся КТ, также оказывает влияние на функцию тромбоцитов. При сравнении гиперконцентрированных КТ, стандартных КТ,

а также КТ, суспендированных в T-Sol ("Baxter") или PAS-27a ("Pall Medical"), наименьшая экспрессия CD62P отмечалась в КТ, суспендированном в PAS-27a [2]. В данной работе изучены КТ, заготовленные методом афереза, суспендированные в 100% донорской плазме и в добавочном растворе SSP⁺, который замещал 70% плазмы (www.mascopharma.com). Добавочный раствор для хранения тромбоцитов рассматривают [22] как дополнительный способ иммунологической и вирусной защиты. Применение аддитивных растворов позволяет сохранить целостность мембраны тромбоцитов и стабильно поддерживать уровень pH среды в течение всего срока хранения, а также уменьшает скорость потребления глюкозы и накопление молочной кислоты [6–9]. В данном исследовании использование добавочного раствора приводило к более выраженной спонтанной активации: в КТ_{ssp+} экспрессия Р-селектина была значимо больше, чем в КТ_{плазма}, причем после редукции патогенов эти различия исчезали, возможно, за счет некоторой активации, вызванной редукцией патогенов. J. de Wildt-Eggen и соавт. [23] сообщили, что использование добавочного раствора PAC-III, состав которого схож с составом SSP⁺, приводило к значимому снижению спонтанной экспрессии CD62P, чего не наблюдалось в наших результатах. Можно предположить, что причиной этого является более низкая концентрация ионов K⁺ и Mg²⁺, так как в нашей работе соотношение добавочного раствора и донорской плазмы было относительно ниже, чем примененное в этом исследовании соотношение (70/30 против 80/20 соответственно) [23].

Доля тромбоцитов, специфически активированных АДФ, в процессе хранения снижалась во всех видах КТ, что свидетельствует об уменьшении их резидуального активационного потенциала [2]. На специфическую активацию тромбоцитов процесс инактивации патогенов по технологии амотосален + УФА статистически значимого влияния не оказал, поэтому доли PAC-1⁺/CD62P⁺ тромбоцитов на всех этапах хранения оказались схожи между КТ_{плазма} и ПРКТ_{плазма}; КТ_{ssp+} и ПРКТ_{ssp+}. Уменьшение в процессе хранения доли тромбоцитов, реагирующих повышением экспрессии Р-селектина на АДФ, можно объяснить либо уменьшением их способности к выбросу Р-селектина из-за истощения его запасов вследствие предшествующей дегрануляции, либо апоптозом части тромбоцитов.

На долю связывания тромбоцитов с антителом PAC-1 влияла среда хранения тромбоцитов: в добавочном растворе на 7-й день хранения она была выше, чем в КТ, суспендированных в плазме (см. таблицу). Наши результаты сопоставимы с результатами работы О.В. Карповой [24], согласно которой при сравнительной оценке КТ, обработанных рибофлавином + УФВ, доля индуцировано активированных тромбоцитов снизилась в процессе хранения.

Возникает вопрос, насколько критично выявляемое *in vitro* увеличение спонтанной экспрессии Р-селектина на поверхности переливаемых тромбоцитов и можно ли переливать тромбоциты с высоким уровнем спонтанной экспрессии Р-селектина. Было показано, что ресуспендирование тромбоцитов в аутоплазме может приводить к улучшению агрегации [25]. После инкубации в цельной крови пациента донорских тромбоцитов в течение

1 ч в них повышалась АДФ-стимулированная экспрессия Р-селектина [26]. Предполагается, что после трансфузии происходит функциональное восстановление переливаемых тромбоцитов [26]. Экспрессию Р-селектина измеряли на тромбоцитах, полученных у больного через 1 ч после трансфузии КТ, и сравнивали с экспрессией Р-селектина *ex vivo* инкубированных донорских тромбоцитов

до трансфузии. После трансфузии *in vivo* отмечена редукция Р-селектин-положительных тромбоцитов на 89%. Предполагается, что Р-селектин-положительные тромбоциты либо быстро удаляются из циркуляции, либо освобождаются от своего Р-селектина, что делает их пригодными для выполнения функции гемостаза [26].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что технология редукции патогенов не влияет на функциональную активность тромбоцитов, заготовленных как в 100% донорской плазме, так и в добавочном растворе SSP⁺, что открывает новые возможности использования данной технологии в рутинной практике для гематологических пациентов, нуждающихся во множественных трансфузиях КТ. Следует отметить, что сочетание применения технологии редукции патогенов со способом заготовки КТ в добавочном растворе с замещением 70% донорской плазмы обеспечивает инфекционную и иммунологическую безопасность. Данное заключение описывает характеристики донорских тромбоцитов в проведенных *in vitro* исследованиях. Для определения клинической значимости полученных результатов целесообразно проведение сравнительного исследования эффективности трансфузий различных типов КТ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савченко В.Г., Гармаева Т.Ц., Куликов С.М., Филатов Ф.П., Судариков А.Б., Михайлова Е.А. Эффективность и безопасность трансфузионной терапии гематологических больных. *Терапевтический архив*. 2006; 7: 12–8.
11. Азимова М.Х., Галстян Г.М., Гапонова Т.В., Карякин А.В., Крюкова Г.Н., Нехаевская С.С. и др. 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; 62(1): 37–40.
12. Постановление Правительства РФ от 26.01.10 №29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» (с изменениями и дополнениями от 12.10.2010, 4.09.2012). Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_96793/.
24. Карпова О.В., Ройтман Е.В., Игнатова А.А., Мадзаев С.Р., Румянцев С.А., Плясунова С.А., Трахтман П.Е. Оценка качества тромбоцитарного концентрата, заготовленного аферезным методом, с использованием добавочного раствора SSP⁺. *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2014; 13(2): 20–4.

Остальные источники литературы пп. 2–10, 13–23, 25, 26 см. в References.

REFERENCES

1. Savchenko V.G., Garmayeva T.Ts., Kulikov S.M., Filatov F.P., Sudarikov A.B., Mikhaylova E.A. The efficacy and safety of transfusion therapy of hematological diseases. *Therapeutic archive. Russian journal (Terapevticheskiy arkhiv)*. 2006; 7: 12–18. (in Russian)
2. Vetlesen A., Mirlashari M.R., Torsheim I.A., Kjeldsen-Kragh J. Platelet activation and residual activation potential during storage of hyperconcentrated platelet products in two different platelet additive solutions. *Transfusion*. 2005; 45(8): 1349–55.
3. Irsch J., Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT. *Transfus. Med. Hemotherapy*. 2011; 38 (1): 19–31. doi: 10.1159/000323937.
4. Hechler B., Ohlmann Ph., Chafey Ph., Ravanat C., Eckly A., Maurer E., et al. Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. *Transfusion*. 2013; 53(6): 1187–200. doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03923.x.
5. Bashir S., Cookson Ph., Wiltshire M., Hawkins L., Sonoda L., Thomas S., et al. Pathogen inactivation of platelets using ultraviolet C light: effect on *in vitro* function and recovery and survival of platelets. *Transfusion*. 2013; 53(5): 990–1000.
6. Sandgren P., Diedrich B. Pathogen inactivation of double-dose buffy-coat platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light: preservation of *in vitro* function. *Vox Sang*. 2015; 108(4): 340–9. doi: 10.1111/vox.12322.
7. Dumont L.J., Larry J., Jose A., Friedman K.D., Vassallo R.R., Whitley P.H., et al. *In vitro* and *in vivo* quality of leukoreduced apheresis platelets stored in a new platelet additive solution. *Transfusion*. 2013; 53(5): 972–80.
8. Council of Europe. Guide to the preparation, use and Quality – Assurance of Blood Components. Strasbourg: Council of Europe Press; 2013. Available at: www.edqm.eu.
9. Gulliksson H., AuBuchon P., Cardigan R., Van Der Meer F., Murphy S., Prowse C. Storage of platelets in additive solutions: a multicentre study of the *in vitro* effects of potassium and magnesium. *Vox Sang*. 2003; 85(3): 199–205. doi: 10.1046/j.1423-0410.2003.00356.x.
10. Gupta A., Chandra T., Kumar A. *In vitro* function of random donor platelets stored for 7 days in compo-sol platelet additive solution. *Asian J. Transfus. Sci*. 2011; 5(1): 11–4. doi: 10.4103/0973-6247.7569.

11. Azimova M.Kh., Galstyan G.M., Gaponova T.V., Karyakin A.V., Kryukova G.N., Nekhaevskaya S.S., et al. Biochemical parameters of donor platelet concentrates during the storage after pathogen inactivation with the aid of technology "Amotosalen + ultra-violet A irradiation" in vitro. *Hematology and Transfusiology, Russian Journal (Gematologiya i transfusiologya)*. 2017; 62(1): 37–40. (in Russian)
12. Decree of the Government of the Russian Federation No 29 of 26 Jan 2010. On approving the technical regulation about safety requirements of blood, its products, blood-substituting solutions and technical means used in transfusion-infusion therapy. (amendments and supplements of 12.10.2010, 4.09.2012). Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_96793/. (accessed 11 Sept 2017) (in Russian)
13. INTERCEPT bloodsystem.com/resource-center/technicalda-sheets/INTERCEPT-blood-system-for-platelets/INTERCEPTviruses.html; <http://www.cerus.com; http://www.amotocalen+УФА.bloodsystem.com> (accessed 11 Sept 2017)
14. Shattil S.J., Hoxie J.A., Cunningham M., Brass L.F. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *Biol. Chem.* 1985; 260(20): 11107–14.
15. 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. doi: 10.1016/j.transci.2005.09.002
16. Klinger M.H. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Ann. Hematol.* 1996; 73(3): 103–12.
17. Rinder H.M., Murphy M., Mitchell J.G., Stocks J., Ault K.A., Hillman R.S. Progressive platelet activation with storage: evidence for shortened survival of activated platelets after transfusion. *Transfusion.* 1991; 31(5): 409–14.
18. Johnston G.I., Bliss B.A., Newman P.J., McEver P.J. Structure of the human gene encoding granule membrane protein-140, a member of the selectin family of the adhesion receptors for leukocytes. *J. Biol. Chem.* 1990; 265(34): 21381–85.
19. Abonnenc M., Sonego G., Cretaz D., Aliotta A., Prudent M., Tissot J.D., Lion N. In vitro study of platelet function confirms the contribution of the ultraviolet B (UVB) radiation in the lesions observed in riboflavin/UVB-treated platelet concentrates. *Transfusion.* 2015; 55(9): 2219–30. doi: 10.1111/trf.13123.
20. Rasongles P., Angelini-Tibert M.F., Simon P., Currie C., Isola H., Kientz D., et al. Transfusion of platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment during a chikungunya virus epidemic in Ile de La Reunion. *Transfusion.* 2009; 49(6): 1083–91.
21. Prowse C.V. Component pathogen inactivation: a critical review. *Vox Sang.* 2013;104 (3): 183–99. doi: 10.1111/j.1423-0410.2012.01662.x
22. Ringwald J., Zimmermann R., Eckstein R. The new generation of platelet additive solution for storage at 22°C: Development and Current Experience. *Transfus. Med. Rev.* 2006; 20(2): 158–64. doi: 10.1016/j.tmr.2005.11.003.
23. de Wildt-Eggen J., Schrijver J., Bins M., Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: effects of magnesium and/or potassium. *Transfusion.* 2002; 42(1): 76–80.
24. Karpova O.V., Roitman E.V., Ignatova A.A., Madzaev S.R., Romyancev S.A., Plyasunova S.A., Trahtman P.E. Evaluation of the quality of platelet concentrates prepared by apheresis method and stored in additive solution SSP+. *Russian Journal Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology (Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii)*. 2014; 13(2): 20–4. (in Russian)
25. Miyaji R., Sakai M., Urano H., Nakata K., Sakamoto H., Shirahata A. Decreased platelet aggregation of platelet concentrate during storage recovers in the body after transfusion. *Transfusion.* 2004; 44(6): 891–9.
26. Bikker A., Bouman E., Sebastian S., Korporaal S.J., Urbanus R.T., Fijnheer R., et al. Functional recovery of stored platelets after transfusion. *Transfusion.* 2016; 56(5): 1030–7. doi: 10.1111/trf.13544.

Поступила 26.09.17

Принята к печати 29.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.151.514-08:616.14-089.819.1

Спирин М.В.¹, Галстян Г.М.¹, Полеводова О.А.¹, Кудлай Д.А.², Полянская Т.Ю.¹,
Зозуля Н.И.¹, Лихачева Е.А.¹, Троицкая В.В.¹

ПЕРИФЕРИЧЕСКИ ИМПЛАНТИРУЕМЫЕ ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ВЕНОЗНЫЕ КАТЕТЕРЫ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНОГО СОСУДИСТОГО ДОСТУПА У БОЛЬНЫХ С ГЕМОМРАГИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России,
125167, г. Москва, Россия;

²ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» ФМБА России, 125371, г. Москва, Россия

Выраженный геморрагический синдром является относительным противопоказанием к катетеризации центральных вен. В то же время в клинической практике нередко возникает необходимость катетеризации центральных вен у больных с нарушениями гемостаза.

Цель работы – анализ использования периферически имплантируемых центральных венозных катетеров (ПИ-ЦВК) у больных с выраженными нарушениями гемостаза.

Результаты. Всего установили 16 ПИ-ЦВК 12 больным с геморрагическим синдромом (6 больных гемофилией, из них у 4 – с наличием ингибитора к FVIII; 1 больная раком молочной железы и болезнью Виллебранда, 3 больных острыми промиелоцитарными лейкозами, 1 – множественной миеломой, 1 – миелодиспластическим синдромом). Гемостаз, при необходимости, обеспечивали введением рекомбинантного активированного фактора свертывания VII (rFVIIa). Срок использования ПИ-ЦВК составил от 5 сут до 1 г и 3 мес. Не было тромботических и инфекционных осложнений при использовании ПИ-ЦВК. ПИ-ЦВК могут рассматриваться как метод выбора для обеспечения длительного сосудистого доступа у больных с геморрагическим синдромом различного генеза. Их установка в условиях ультразвуковой навигации безопасна и эффективна. В зависимости от планируемого лечения, характера геморрагического синдрома подход к выбору ПИ-ЦВК (наличие клапана Грошонг, силиконовые или высокопоточные полиуретановые катетеры, измерение центрального венозного давления и т.д.) должен быть дифференцированным. У этой категории больных ПИ-ЦВК могут рассматриваться как альтернатива нетуннелируемым катетерам и полностью имплантируемым сосудистым устройствам.

Ключевые слова: геморрагический синдром; гемофилия; ингибитор к фактору VIII; рекомбинантный активированный фактор VIIa; острый промиелоцитарный лейкоз; периферически имплантируемый центральный венозный катетер.

Для цитирования: Спирин М.В., Галстян Г.М., Полеводова О.А., Кудлай Д.А., Полянская Т.Ю., Зозуля Н.И., Лихачева Е.А., Троицкая В.В. Периферически имплантируемые центральные венозные катетеры для обеспечения длительного сосудистого доступа у больных с геморрагическим синдромом. *Гематология и трансфузиология*. 2017; 62(4): 203–210. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2017-62-4-203-210>