

**Ф.С. Шерстнев, М.Е. Ковтунова, А.А. Костяев, С.В. Утемов,
К.А. Ветошкин**

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДИНАМИКИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО
СИНДРОМА У ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ ПОСЛЕ
ТРАНСФУЗИЙ НАТИВНЫХ И КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ
ТРОМБОЦИТНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ**

**ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА
России»**

Трансфузии тромбоцитных концентратов (ТК) в настоящее время - единственный общепринятый во всем мире эффективный метод профилактики и лечения тромбоцитопенического геморрагического синдрома у онкогематологических больных. Ежегодно в мире на фоне снижения числа переливаний эритроцитов наблюдается рост потребления ТК на 5 –7 %. При этом проблема обеспечения реципиентов тромбоцитами остается не решенной. Ограниченность срока годности нативных тромбоцитов, непредсказуемость момента, когда пациенту потребуются их экстренное переливание, а также относительная трудозатратность получения ТК требуют поиска новых путей обеспечения этой трансфузионной средой.

В современных условиях определенную гибкость в управлении ресурсами кровяных пластинок для обеспечения растущих потребностей онкогематологических клиник может придать создание запаса криоконсервированных ТК. Несмотря на большой спектр известных методов их замораживания, единственным разрешенным в России является способ криоохлаждения тромбоцитов при температуре минус 196⁰С с ограждающим раствором «Тромбокриодмац» [1]. Трудоемкость и затратность жидкоазотного метода криоконсервирования ограничивает применение криоконсервированных ТК в клинической практике. Вместе с тем создан метод консервирования тромбоцитов с диметилацетамидом в электрических морозильниках при -80⁰С, исключаяющий необходимость в жидком азоте [2, 3]. Однако до настоящего времени не изучена клиническая эффективность и целесообразность применения нового экономичного метода криоконсервирования тромбоцитов.

Сдерживающим моментом для широкого использования криоконсервированных тромбоцитов в клинической практике является относительное малое число публикации об эффективности использования криоконсервированных ТК. Преимущественно криоконсервированные ТК рекомендуются для использования при оказании трансфузиологической помощи в условиях чрезвычайных ситуаций.

С целью изучения эффективности оценили результаты трансфузий ТК, криоконсервированных в терапевтических дозах, в сравнении с нативными тромбоцитами у больных острыми лейкозами. Кровяные пластинки замораживали методом быстрого двухступенчатого замораживания с криопротектором «Тромбокриодмац» при минус 80⁰С. Их заготовку

осуществляли аппаратным методом с помощью сепаратора «Amicus» фирмы «Baxter».

Заготовили 54 образца донорских ТК. Полученные тромбоциты подвергали низкотемпературному замораживанию в пластиковых контейнерах «Компопласт 300» под защитой криоконсерванта «Тромбокриодмац». Для криоконсервирования биообъектов по двухэтапной экспоненциальной программе использовали электроморозильники на -30°C и -80°C .

Срок хранения криоконсервированных ТК составил 106 ± 10 суток. Отбор проб для исследования проводили из гемоконтейнера после окончания трансфузии. Период времени между размораживанием ТК и трансфузией составил 15 – 50 минут.

Исследование функциональной активности тромбоцитов осуществляли трижды: непосредственно после их выделения из крови, перед замораживанием и после отогрева замороженных образцов. Подсчет количества тромбоцитов до начала и по окончании замораживания выполняли в камере Горяева в двух параллельных пробах с вычислением концентрации и общего содержания данных клеток в ТК.

Функциональную полноценность тромбоцитов исследовали с помощью определения адгезивности к стеклу и индуцированной агрегации клеток фотометрическим методом с использованием лазерного агрегометра «Биола» (модель LA – 230) на 10 минуте после добавления индукторов агрегации. Агрегацию тромбоцитов изучали с основными индукторами: аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 2,5 мкг/мл, коллаген – 2 мг/мл, ристомицин – 1,5 мг/мл, адреналин - 2,5 мкг/мл.

Реакцию на гипотонический шок (РГШ) определяли методом R. Handin с помощью спектрофотометра СФ-46 при длине волны 610 нм в течение 10 минут. Величины агрегации и РГШ исследовали в пробах при стандартном количестве тромбоцитов 250 000 – 350 000 /мкл. Для исследования рН концентрата тромбоцитов и криоконсервирующих растворов использовали иономеруниверсальный ЭВ-74 и иономер рН – 150.

В исследование включены результаты лечения 30 больных онкогематологическими заболеваниями, получивших трансфузии ТК (13 женщин и 17 мужчин). Возраст больных находился в пределах от 22 лет до 68 лет (медиана возраста – 51 год). В качестве контроля анализировали результаты трансфузий нативных ТК тем же пациентам. Это позволяло исключить влияние индивидуальных особенностей реципиента на конечный результат (диагноз, наличие сопутствующих отягощающих факторов, иммунной рефрактерности).

Диагноз заболевания устанавливали на основании клинической картины, лабораторных критериев, в том числе данных миелограммы, трепанобиопсии, гистологического и иммуногистохимического исследования лимфоузлов. У 14 пациентов диагностирован острый миелобластный лейкоз, у 3 – острый лимфобластный лейкоз, у 5 – неходжкинская лимфома,

хронический лейкоз – у 2, миелодиспластический синдром – у 1, другие гематологические заболевания – у 5 больных .

Среди больных острым миелобластным лейкозом двоим с М3 вариантом (FAB - классификация) проводили курс химиотерапии индукции по протоколу лечения промиелоцитарного лейкоза, 2 пациентов получали лечение по поводу рецидива лейкоза, остальные находились в динамике химиотерапии. Все больные острым лимфобластным лейкозом лечились по схеме индукции ремиссии, у 2 их них заболевание дебютировало с гиперлейкоцитоза, осложненного ДВС – синдромом. У 1 пациента миелодиспластический синдром развился вторично по отношению к множественной миеломе, отмечалась резистентность к лечению. У 1 больного хроническим миелолейкозом зарегистрирован бластный криз, 1 - с хроническим лимфолейкозом находился в состоянии длительной гипоплазии кроветворения после химиотерапии флюдарабином. Среди пациентов с лимфомой у 2 зарегистрировано состоянии рецидива, у 3 - период ремиссии.

Все обследованные получали ранее гемокомпонентную терапию. Количество предшествующих трансфузий ТК составило от 4 до 60 ($15,55 \pm 4,95$).

Переливание ТК назначали с лечебной целью пациентам с глубокой тромбоцитопенией при возникновении проявлений спонтанного тромбоцитопенического геморрагического синдрома (ГС). Профилактические трансфузии ТК проводили при количестве тромбоцитов $10 \times 10^9/\text{л}$, на фоне курсов интенсивной полихимиотерапии или ДВС-синдрома, лихорадки, сепсиса, спленомегалии, а также при пороговом уровне пластинок - $20 \times 10^9/\text{л}$, у больных промиелоцитарным лейкозом в острой фазе заболевания или у клинически стабильных пациентов перед выполнением инвазивных процедур при числе клеток $50 \times 10^9/\text{л}$. Размороженный ТК переливали в случае отсутствия нативного на момент выявления показаний к трансфузии.

Методы определения клинической эффективности криоконсервированных ТК включали подсчет кровяных пластинок в крови реципиента до и после трансфузии размороженных клеток, наблюдение за динамикой течения ГС. Наиболее важным показателем жизнеспособности перелитых пластинок считают динамику ГС, однако в ряде случаев представляется затруднительным определить время начала или окончания кровотечения. Прирост тромбоцитов в крови реципиента позволяет количественно оценить их «приживление» и «выживаемость» в сосудистом русле. При этом известно, что число этих клеток в крови может не повыситься по причинам, не зависящим от результатов криоконсервирования, а удовлетворительный гемостатический эффект будет наблюдаться и при отсутствии прироста тромбоцитов [1, 4]. Традиционно для подтверждения эффективности трансфузий принято использовать оценку клинические проявления спонтанной кровоточивости и количественное определение скорректированного прироста тромбоцитов (СПТ) через 1 час (СПТ₁) и 18-24 часа (СПТ₁₈₋₂₄) после ее проведения [5].

Показатель СПТ вычисляли по формуле:

$$(A - B) \times S$$

$$\text{СПТ} = \frac{\text{-----}}{C}$$

где: А - число тромбоцитов после трансфузии ($\times 10^9/\text{л}$);

В - число тромбоцитов до трансфузии ($\times 10^9/\text{л}$);

С - площадь поверхности тела реципиента (м^2);

С - число перелитых тромбоцитов ($\times 10^{11}$).

Трансфузию ТК считали результативной при прекращении спонтанной кровоточивости, отсутствии свежих геморрагических проявлений на коже и видимых слизистых, а также минимальном значении $\text{СПТ}_1 \geq 7,5 \times 10^9/\text{л}$ и $\text{СПТ}_{18-24} \geq 4,5 \times 10^9/\text{л}$.

Степень тяжести тромбоцитопенического геморрагического синдрома определяли по шкале ВОЗ [6]. Отсутствие геморрагий оценивали как 0 баллов; один балл соответствовал появлению петехий, гематом на слизистых и незначительных наружных кровотечений. Наличие мелены, гематурии, кровохарканья, маточного, носового кровотечения свыше часа, не требующих трансфузий эритроцитов, оценивали как два балла. Три балла присваивали при наличии любых анемизирующих геморрагий, требовавших переливания эритроцитов; любые фатальные кровопотери расценивали как 4 балла.

Выявление в сыворотке крови больных антилимфоцитарных антител свидетельствовало о развитии НЛА-сенсбилизации. Учитывали также наличие у реципиентов неиммунных отягощающих факторов: ДВС-синдром, инфекция с фебрильной лихорадкой, сепсис, сленомегалия, введение амфотерицина В. Указанные клинические факторы присутствовали у реципиентов при 16 трансфузиях ТК.

Цифровые данные исследований подвергали статистической обработке с помощью программы Biostat. Достоверность различий определяли с использованием критерия Стьюдента, для выборок, не имеющих нормального распределения – с помощью критерия Манна – Уитни. Оценку отличий показателей повторных трансфузий одним и тем же реципиентам производили с использованием критерия Уилкоксона. Анализ различий качественных признаков проводили с помощью критерия Хи-квадрат [7]. Достоверными отличия считали при $p < 0,05$.

При подсчете количества тромбоцитов в крови реципиентов до, через час и через сутки после переливания размороженных ТК получены следующие результаты. Среднее число пластинок, определенное в периферической крови через 1 час после трансфузии достоверно повысилось, а через 18-24 часов оказалось снижено, но оставалось значимо выше исходного уровня ($p < 0,05$). «Восстановление» уровня тромбоцитов ($\text{СПТ}_{1\text{час}}$) составило $6,5 \pm 1,42 \times 10^9/\text{л}$, «выживаемость» кровяных пластинок на следующие сутки ($\text{СПТ}_{18-24\text{ч}}$) $2,1 \pm 2,61 \times 10^9/\text{л}$.

Кроме подсчета количества тромбоцитов оценили динамику спонтанного тромбоцитопенического геморрагического синдрома у реципиентов криоконсервированных ТК. Показанием к таким трансфузиям в 45% случаев служили проявления ГС, соответствующие 2-3 степени ВОЗ, в 33% - 1 степени, в 22% - они выполнены с профилактической целью при отсутствии кровоточивости. Наиболее существенным результатом явилось то, что после переливания размороженных тромбоцитов уменьшилось число пациентов, у которых выявлялся значимый ГС, с 45% до 8%, а количество реципиентов с отсутствием ГС увеличилось с 6 (22%) до 16 (59%). Различия в распределении пациентов по степени тяжести ГС до и после трансфузий были статистически достоверными ($p=0,003$).

Число реципиентов, у которых ГС не был выявлен на следующие сутки после трансфузии среди больных, имевших ГС, соответствовавший 0 и 1 баллам, составило 18 (86%) и 8 (57%) соответственно. У 4 пациентов (13%) с ГС, соответствовавшим 2-3 баллам, после трансфузий ТК его расценивали как 0 – 1 балл. При этом необходимо отметить, что у 1 реципиента кровотечение усилилось и дополнительно потребовалось переливание эритроцитарной массы, а у 1 больной динамики не наблюдалось. Таким образом, криоконсервированные тромбоциты купировали ГС выраженностью в 2-3 балла, либо уменьшали его выраженность до 1 балла. Неэффективные трансфузии, после которых сохранялся ГС 2-3 степени, зарегистрированы в 8% случаев.

Сравнение трансфузий криоконсервированных и нативных ТК показало, что после переливания размороженных тромбоцитов к моменту трансфузии нативных ТК частота выявления значимого ГС (2 и 3 степени тяжести) снизилась с 45% до 8%. Количество больных, у которых через сутки ГС не отмечен, увеличилось после трансфузий криоконсервированных ТК с 22 до 59% ($p<0,05$), а нативных – с 59 до 67% ($p>0,05$).

При анализе динамики количества тромбоцитов в крови реципиентов выявлено, что СПТ_{1 час} после переливания нативных ТК соответствовал критерию эффективности как при наличии отягощающих факторов, так и без них – средний показатель составил $9,4 \pm 1,86 \times 10^9/\text{л}$. Аналогичный показатель при трансфузиях размороженных кровяных пластинок был ниже независимо от наличия указанных факторов - $6,5 \pm 1,42 \times 10^9/\text{л}$. Несмотря на удовлетворительный прирост клеток через 1 час суточный прирост после переливаний нативных и криоконсервированных ТК был ниже критерия эффективности – соответственно $2,6 \pm 1,06$ и $2,1 \pm 0,94 \times 10^9/\text{л}$.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что экстренность трансфузий была связана с наличием различных факторов риска кровоточивости или их сочетаниями. Эти факторы риска одновременно расцениваются в качестве отягощающих – предикторов неэффективности переливания, что обусловило низкие приросты числа тромбоцитов через сутки после переливания как размороженных, так и нативных ТК. Трансфузии криоконсервированных тромбоцитов оказывали не меньший

гемостатический эффект, чем нативные. В обеих группах после трансфузий наблюдалось уменьшение числа пациентов с выраженным ГС.

Список литературы

1. Аграненко, В.А. Кримоконсервированные тромбоциты и их клиническая эффективность // Гематология и трансфузиология. 1987. № 5. С. 22-24.
 2. Захаров, В. В. Консервирование тромбоцитов замораживанием при -80°C под защитой диметилацетамида: Автореф. дис. . канд. мед. наук. СПб. 1996. 22 с.
 3. Кузнецов, К.В. Консервирование тромбоцитов замораживанием при -80°C по экспоненциальной программе: Автореф. дис. канд. мед. наук. СПб., 2006. 23 с.
 4. Slichter, S.J. New thoughts on the correct dosing of prophylactic platelet transfusions to prevent bleeding // *Curr Opin Hematol.* 2011;18(6): P. 427-35
 5. Slichter, S.J. Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients / S.J. Slichter, K. Davis, H. Enright // *Blood.*- May 2005.- Vol. 105.- №. 10, p. 4106-4114.
 6. Bercovitz, R. S., O'Brien S. H. Measuring bleeding as an outcome in clinical trials of prophylactic platelet transfusions // *Hematology.* – 2012; 2012 (1): p. 157-160
- Гланц, С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998, 459 с.