

ПОКАЗНИКИ ЯКОСТІ ДОНОРСЬКОЇ ПЛАЗМИ, ОТРИМАНОЇ МЕТОДАМИ ПЛАЗМАФЕРЕЗУ ТА ПЕРВИННОГО ФРАКЦІОНУВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ ГЕМОКОНСЕРВАНТІВ ТА ЛЕЙКОЦИТАРНИХ ФІЛЬТРІВ

О. І. Малигон, В. Л. Новак

Харківський обласний центр служби крові,
Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України, м. Харків

THE INDICES OF QUALITY OF THE DONOR'S PLASMA, OBTAINED BY THE METHODS OF PLASMAPHERESIS AND PRIMARY FRACTIONING, USING VARIOUS HEMOCONSERVANTS AND LEUKOCYTIC FILTERS

O. I. Maligon, V. L. Novak

Одним з критеріїв роботи закладів служби крові (ЗСК) є наявність ефективних, функціонально повноцінних і безпечних компонентів крові, зокрема, свіжозамороженої плазми (СЗП) та виготовлених з неї препаратів, що забезпечується дотриманням оптимальних умов виділення плазми і процесу її заморожування та зберігання.

Понад 67% плазми, що заготовляють у світі, отримують з використанням методу ПА [1], який є безпечнішим для донора і дозволяє отримати більший об'єм плазми від одного донора з високим вмістом білків гемокоагуляції [2].

Для підвищення інфекційної безпеки компонентів крові та препаратів донорської плазми у ЗСК широко використовують лейкоцитарні фільтри [3, 4], які паралельно можуть справляти вплив на показники гемостатичного потенціалу плазми [5 – 7].

В діяльності ЗСК України вибір методу отримання плазми, насамперед, визначається їх технічними можливостями та оснащенням, а в існуючих сьогодні вимогах щодо якості СЗП не завжди взяті до уваги особливості виробничих етапів і технологічних процесів отримання компонентів крові, тому визначення якості нативної плазми з огляду на технологію її виготовлення є метою нашого дослідження.

Реферат

Проведена оцінка показників якості плазми, найбільш безпечною та функціонально повноцінною визначено плазму, отриману з використанням методу плазмаферезу (ПА), у порівнянні з методами фракціонування з застосуванням двох режимів центрифугування донорської крові, заготовленої за допомогою різних гемоконсервантів. Визначено доцільність використання та впровадження технології диференційованого центрифугування, що забезпечує раціональне використання донорської крові. Після процедури лейкофільтрації консервованої крові та плазми значно зменшується вміст залишкових клітин на тлі збереження активності факторів зсідання крові.

Ключові слова: донорська кров; нативна плазма; питома активність факторів зсідання крові; залишкові клітини; плазмаферез; фракціонування; гемоконсервант; лейкофільтрація.

Abstract

There was estimated quality of the plasma indices; so in comparison with the fractioning methods, using two regimens of the donor's blood centrifugating, harvested with the help of various conservants, the most secure and functionally adequate plasma preparation was determined such, which is obtained with the help of plasmapheresis procedures. The expediency of application and introduction of the differentiated centrifugation technology, providing rational usage of a donor's blood, was determined. After conduction of leukofiltration of the conserved blood and plasma the residual cells content is reducing significantly, while preserving activity of the blood coagulation factors.

Key words: donor's blood; native plasma; percentage of activity of the blood coagulation factors; residual cells; plasmapheresis; fractioning; hemoconservant; leukofiltration.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота проведена на базі Центру з використанням плазми крові від 140 донорів (20 — кадрових, 40 — первинних).

Плазму отримували методом ПА з використанням автоматизованої системи "Autopheresis—C" (Вахтер, США) з вбудованою системою фільтрів відповідно до інструкції виробника, та методу первинного фракціонування консервованої донорської крові за двома режимами

центрифугування: перший — при 1250 g протягом 20 хв при температурі +4...+6°C; другий — при 2150 g протягом 20 хв при температурі +20...+24°C на центрифугах MPW — 400 (Польща). Використані системи контейнерів: 500/400 "Глюгидир" 100 мл (ВАТ "Синтез", Росія), 450/400 CPDA — 1 63 мл ("Ravimed", Польща), 450/400/400/400 CPD 63 мл ("Terumo", Японія).

Лейкоцити видаляли з донорської крові за допомогою системи контейнерів 450/400/400 CPD 63 мл

Якість плазми, отриманої при використанні методів первинного фракціонування консервованої крові та ПА

Показник	Величина показника залежно від способу отримання плазми		
	ПА, гемоконсервант	фракціонування консервованої крові, гемоконсервант CPD	
		1250 g 20 хв при +4...+6 ° C	2150 g 20 хв при +20...+24 ° C
Залишкові еритроцити, $\times 10^9$ в 1 л	0,2 (0,1; 0,2)	1,1*# (0,9; 1,2)	0,6* (0,5; 0,7)
Залишкові лейкоцити, $\times 10^9$ в 1 л	0,02 (0,01; 0,02)	0,07*# (0,07; 0,08)	0,04* (0,03; 0,04)
Залишкові тромбоцити, $\times 10^9$ в 1 л	15,0 (13,5; 17,5)	31,0*# (29,0; 36,0)	19,0* (16,0; 25,0)
Загальний білок, г/л	67,4 (67,3; 67,8)	71,2*# (70,4; 71,5)	70,4* (70,0; 70,6)
ФVIII, МО/мл	1,37 (1,24; 1,58)	1,11*# (1,05; 1,2)	1,25* (1,2; 1,31)
ФIX, МО/мл	1,30 (1,19; 1,54)	1,03*# (0,99; 1,12)	1,21* (1,15; 1,26)

Примітка. Різниця показників достовірна у порівнянні з такими при:
* – проведенні ПА; # – фракціонуванні 2150 g 20 хв при +20...+24 ° C ($p < 0,05$).

("Pall Medical", Німеччина) з вмонтованим фільтром "Leukotrap WB—Pall", через 1 год після венепункції при температурі +20 ... +22°C в умовах замкнутої системи. З плазми лейкоцити видаляли з застосуванням приєднаного фільтра "Лейко-сеп ПЛ" (ЗАТ "Інтер ОКО", Росія) одразу після центрифугування дози крові.

В отриманих зразках плазми донорської крові визначали показники її якості. Вміст загального білка визначали на спектрофотометрі PV 1251С (ЗАТ "Спектроскопия, оптика и лазеры — авангардные разработки", Білорусь) з використанням біуретового реактиву за довжини хвилі 540 нм та довжини оптичного шляху 10 мм. Залишкову кількість клітин визначали оптичним методом за допомогою світлового мікроскопа (зб. $\times 100$). Еритроцити і лейкоцити рахували по всій поверхні сітки лічильної камери Фукса — Розенталя; тромбоцити — у 25 великих або 400 малих квадратах лічильної камери Горяєва. Концентрацію клітин обчислювали за об'ємом квадратів камери і розведенням зразка.

pH визначали на потенціометрі pH—метр Seven Easy (Mettler Toledo, Японія).

Питому активність ФVIII та ФIX визначали за допомогою механічного запрограмованого коагулометра відкритого типу з вмонтованим термопринтером "Аналізатор показників гемостазу 4—02 П" (Росія). Принцип методу оснований на встановленні лінійної залежності між ФVIII, ФIX і тривалістю їх зсідання у тесті активованого частково тромбoplastинового часу (АЧТЧ).

Відмінності між показниками оцінювали за непараметричним критерієм Манна — Уїтні. Для кількісних показників параметри статистики наведені як медіана та квартилі — Me(Q1; Q3). Статистичний аналіз результатів проводили з використанням програмного пакета "Statistica 10" [8].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показники якості плазми, отриманої при використанні методів ПА та первинного фракціонування окремих доз консервованої крові з застосуванням центрифуг, свідчать про їх суттєві відмінності. Використання автоматичного ПА дозволяє отримати стандартизовані дози плазми по 800 ($\pm 0,5$) мл, об'єм яких в 3 — 3,5 рази перевищує об'єм плаз-

ми, одержаної з окремих доз крові.

Порівняння кількості залишкових клітин у досліджених зразках плазми свідчило про переваги використання технології ПА та фракціонування за режимом 2150 g протягом 20 хв при температурі +20...+24°C, що практично не різнилися (див. таблицю). Кількість клітин при використанні цього методу центрифугування свідчила про високі характеристики отриманих доз плазми; різниця показників вірогідна у порівнянні з такими при застосуванні центрифугування 1250 g протягом 20 хв при температурі +4 ... +6°C ($p = 6,7 \times 10^{-8}$ — для кількості залишкових лейкоцитів, $p = 7,1 \times 10^{-6}$ — для кількості залишкових тромбоцитів).

Ключовими характеристиками якості плазми є питома активність факторів зсідання крові та вміст загального білка. Питома активність лабільного ФVIII та стабільного ФIX у плазмі, отриманій за методом ПА, більша, ніж при використанні методів фракціонування за допомогою центрифуг ($p < 0,05$), тоді як вміст загального білка був дещо меншим завдяки вбудованій системі лейкофільтрації. При порівнянні питомої активності факторів зсідання крові у зразках плазми, отриманої з застосуванням двох режимів центрифугування, встановлено їх більшу активність при використанні високої швидкості центрифугування — 2150 g протягом 20 хв при температурі +20...+24°C.

Якість плазми, яку отримували шляхом центрифугування окремих доз крові, заготовленої з використанням різних консервантів, не залежала від виду гемоконсерванту. Поряд з цим, відзначено, що зразки плазми, отриманої з окремих доз крові, заготовленої за допомогою консерванту "Глюгидир", мають нижчу рН — 6,9 (6,8; 6,9) у порівнянні з такою при застосуванні гемоконсервантів CPD та CPDA—1 — 7,3 (7,3; 7,4). Визначена обернена достовірна кореляція між показниками питомої активності ФVIII і рН ($p = 0,04$).

Лейкоцитарні фільтри забезпечували зменшення вмісту залишко-

вих еритроцитів та лейкоцитів у порівнянні з таким у нефільтрованих зразках, при їх використанні на етапі обробки як консервованої крові, так і плазми, отриманої після розділення крові; розбіжності достовірні у порівнянні з показниками до застосування фільтрів ($p < 0,05$). Так, у зразках плазми, отриманих шляхом фільтрації консервованої донорської крові до центрифугування, вміст залишкових еритроцитів становив $0,3 (0,3; 0,4) \times 10^9$ в 1 л, лейкоцитів — $0,02 (0,01; 0,03) \times 10^9$ в 1 л і практично не змінювався; вміст залишкових тромбоцитів, а в зразках плазми, фільтрованих після центрифугування, домішок еритроцитів становив $0,02 (0,02; 0,02) \times 10^9$ в 1 л, лейкоцитів — $23,0 (20,0; 28,0) \times 10^9$ в 1 л, тромбоцитів — $23,0 (20,0; 28,0) \times 10^9$ в 1 л, розбіжності достовірні у порівнянні з показниками до застосування фільтрів ($p < 0,05$). За показниками питомої активності факторів зсідання крові, лейкофільтрація практично не спричиняє втрати факторів, проте, як і при застосуванні методу ПА, зменшується вміст загального білка на 2 — 3% у порівнянні з таким у нефільтрованих зразках.

Відмінності питомої активності ФВІІІ та ФІХ при використанні методів фракціонування плазми за двома різними режимами — 1250 г та 2150 г зумовлені не тільки швидкістю центрифугування під час розділення крові, а й температурним режимом. Навіть за короткочасного зниження температури до $+15...+18^\circ\text{C}$ і менше можлива акти-

вація тромбоцитів. Активовані тромбоцити запускають механізм коагуляції клітин у вилученій з судинного руслу донора дозі крові, і білки зсідання плазми можуть залучатися до каскаду активації—агрегації/деагрегації. Під час цього процесу, можливо, і відбувається часткова втрата питомої активності факторів зсідання крові.

Спосіб фракціонування консервованої донорської крові за режимом 2150 г (метод диференційованого центрифугування) у практиці ЗСК України не набув широкого застосування, хоча отримана за цим способом плазма характеризується більш високою питомою активністю факторів зсідання крові та низьким рівнем залишкових лейкоцитів і особливо тромбоцитів без використання лейкофільтрів, що є основною його перевагою. До того ж, використання методу диференційованого центрифугування дозволяє отримати з окремих доз консервованої крові не тільки плазму, а й еритроцити і лейкоцитарний шар (ЛТШ), з якого в подальшому отримують компонент "Тромбоцити, відновлені з дози крові". Ця технологія забезпечує більш раціональне використання донорської крові.

Розчини консервантів можуть надмірно пригнічувати активність чинників системи коагуляції та тромбоцитів, а за граничного відхилення рН від фізіологічних норм спричинити денатурацію білкових комплексів і лізис клітин. Встановлена залежність питомої активності ФВІІІ та ФІХ від рН пояснюється не-

значним інгібуванням клітинної та плазмової ланок системи гемостазу, які відбуваються при рН отриманої плазми менше 7,2.

Таким чином, показники якості зразків плазми на різних етапах її виробництва свідчать про високий гемостатичний потенціал плазми, отриманої методом ПА з вмонтованою системою лейкофільтрів. Досягнуті максимальна питома активність факторів зсідання крові ФВІІІ і ФІХ та мінімальна кількість домішок залишкових клітин.

Експериментально встановлена можливість отримання якісної плазми з окремих доз консервованої донорської крові методом центрифугування, що передбачає вилучення ЛТШ. Застосування режиму 2150 г протягом 20 хв при температурі $+20...+24^\circ\text{C}$ дозволяє отримати плазму з низьким вмістом залишкових клітин, особливо тромбоцитів, при збереженні належного рівня специфічних білків системи гемостазу.

Визначена доцільність використання лейкоцитарних фільтрів на етапі фільтрації компоненту після центрифугування: у фільтрованому компоненті вміст залишкових еритроцитів та лейкоцитів суттєво зменшений на тлі збереження специфічних білкових факторів зсідання крові.

Під час заготовляння донорської плазми найбільшою мірою на її якість впливає спосіб отримання та застосування лейкофільтрації, вплив гемоконсерванту не виражений.

ЛІТЕРАТУРА

1. Specific protein content of pools of plasma for fractionation from different sources: impact of frequency of donations / R. Laub, S. Baurin, D. Timmerman [et al.] // *Vox. Sang.* — 2010. — Vol. 99, N 3. — P. 220 — 231.
2. Coagulation parameters in apheresis and leukodepleted whole-blood plasma during storage / F. Bostrom, M. Sjodahl, L. Wehlin [et al.] // *Transfusion.* — 2007. — Vol. 47, N 3. — P. 460 — 463.
3. Тотолян А. А. Иммуноглобулины в клинической и лабораторной диагностике / А. А. Тотолян, Н. А. Марфишева, Н. А. Тотолян. — СПб.: АО "Стибиум плюс", 1996.—30 с.
4. Guidelines on the clinical use of leucocyte depleted blood components. BCSH // *Transfus. Med.* — 1998. — Vol. 8. — P. 59 — 71.
5. The effect of filtration on residual levels of coagulation factors in plasma / H. S. Alhumaidan, T. A. Cheves, S. Holme, J. D. Sweeney // *Am. J. Clin. Pathol.* — 2013. — Vol. 139, N 1. — P. 110 — 116.
6. Effects of extended storage of whole blood before leucocyte depletion on coagulation factors in plasma / E. Kretzschmar, F. Kruse, O. Greiss [et al.] // *Vox Sang.* — 2004. — Vol. 87, N 3. — P. 156 — 164.
7. Plasma quality after whole—blood filtration depends on storage temperature and filter type / M. Heiden, U. Salge, R. Henschler [et al.] // *Transfus. Med.* — 2004. — Vol. 14, N 4. — P. 297 — 304.
8. Гланц С. Медико—биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1998. — 459 с.