

УДК: 615.38.012:612.111: 615.014.41

Организационные аспекты использования криоконсервирования эритроцитов в деятельности учреждений службы крови Российской Федерации

Д-р мед. наук А. В. ЧЕЧЕТКИН¹, д-р мед. наук В. В. ДАНИЛЬЧЕНКО²,
д-р мед. наук С. Д. ВОЛКОВА³, канд. мед. наук А. Б. МАКЕЕВ⁴,
канд. мед. наук В. Е. СОЛДАТЕНКОВ,
канд. мед. наук Г. Ю. КИРЬЯНОВА, канд. мед. наук А. Д. КАСЬЯНОВ,
И. С. ГОЛОВАНОВА

¹bloodscience@mail.ru, ²rniiht@mail.ru, ³volk.serafima@yandex.ru,
⁴mak57spb.@yandex.ru

Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА
191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16

В статье проведен анализ показателей заготовки криоконсервированных эритроцитов и их использования для клинических целей в медицинских организациях России. Выявлены тенденции развития криоконсервирования эритроцитов на станциях и отделениях переливания крови (центрах крови) в федеральных округах Российской Федерации. Представлены перспективные разработки по вопросам криоконсервирования эритроцитов: методы замораживания красных клеток крови при ультранизких и умеренно низких температурах под защитой сниженной концентрации глицерина (15–20%), с оптимизированной процедурой деглицеринизации эритроцитов (двукратным центрифугированием и использованием растворов натрия хлорида в понижающихся концентрациях), метод отсроченного отмывания эритроцитов после их размораживания и хранения при 4 град. С, технология заготовки и создания запасов лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов для обеспечения иммунологической и инфекционной безопасности их трансфузий.

Ключевые слова: служба крови, криоконсервирование эритроцитов, отсроченное отмывание эритроцитов.

Organizational aspects of red blood cells cryopreservation in the activities of blood service in Russian Federation

Dr. med. sc. A. V. CHECHETKIN, Dr. med. sc. V. V. DANILCHENKO,
Dr. med. sc. S. D. VOLKOVA, Ph. D. in medicine A. B. MAKEEV,
Ph. D. in medicine V. E. SOLDATENKOV, Ph. D. in medicine G. YU. KIRYANOVA,
Ph. D. in medicine A. D. KASYANOV, I. S. GOLOVANOVA

Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology of Federal medico-biological Agency
191024, Russia, St. Petersburg, 2 Sovetskaya St., 16

In article the factors of cryopreserved erythrocytes preparation and their use for clinical purposes in Russian medical institutions were analyzed. The tendencies of red blood cells cryopreservation development at stations and departments of blood transfusion (blood centers) in the Federal Districts of the Russian Federation were revealed. The main developments on cryopreservation of red blood cells are presented here: methods of freezing the red blood cells at ultra-low and moderately low temperatures protected by reduced concentration of glycerol (15–20%), with the optimized procedure of washing up the erythrocytes (double centrifugation and using solutions of sodium chloride in decreasing concentration); method of deferred washing up of erythrocytes after defrosting and storing at 4 deg C; the technology of procurement and stockpiling the leukoreduced quarantined erythrocytes for immunological and infectious safety of transfusions.

Keywords: blood service, erythrocytes cryopreservation, delayed erythrocytes washing.

Введение

Криоконсервирование является единственным способом длительного хранения эритроцитов для клинического использования, повышающим доступность и качество оказания трансфузиологической помощи населению [1]. Ранее проведенные исследования выявили гетерогенность степени внедрения этой технологии в трансфузиологическую практику в России [2]. По мере реализации мероприятий Государственной программы развития

службы крови, возникли существенные предпосылки для использования технологий длительного хранения клеток крови в повседневной деятельности станций (отделений переливания крови) и центров крови [3]. В Российской Федерации криоконсервирование эритроцитов используется в службе крови для создания резерва эритроцитных компонентов для текущего обеспечения медицинских организаций и при ликвидации медицинских последствий чрезвычайных ситуаций, формирования запаса

эритроцитов, имеющих редко встречающийся фенотип, развития программ предоперационного аутодонорства клеток крови, карантинизации и т. д. [4–7].

Целью работы явилось исследование организационных аспектов внедрения методов криоконсервирования эритроцитов в деятельность учреждений службы крови Российской Федерации.

Материалы и методы

Был проведен анализ материалов об использовании методов замораживания эритроцитов в деятельности учреждений службы крови Российской Федерации на основе данных, представленных в отраслевых статистических наблюдениях за период 2009–2013 гг. Изучены показатели заготовки криоконсервированных эритроцитов в учреждениях службы крови и количество выданных в медицинские организации декриоконсервированных эритроцитов, исходя из территориального деления на федеральные округа (ФО) России. Математическая обработка статистических показателей проводилась с использованием прикладных компьютерных программ.

Результаты и обсуждение

Установлено, что объем заготовки замороженных эритроцитов в службе крови России за период с 2009 по 2013 г. снизился на 28,8% (рис. 1). В последние годы следует отметить стабилизацию показателей заготовки криоконсервированных эритроцитов в стране, а в 2013 г.



Рис. 1. Динамика показателей заготовки и выдачи криоконсервированных эритроцитов в 2009–2013 гг. в России

наблюдался рост значения этого показателя по сравнению с 2011 и 2012 г. Во многом это может быть объяснено реализацией Государственной программы развития службы крови России, в результате которой было обновлено технологическое оборудование, в том числе и для криоконсервирования клеток крови [3]. Тем не менее, объем выдачи учреждениями службы крови декриоконсервированных эритроцитов в медицинские организации за указанный период наблюдения снизился на 38,6%.

В структуре заготовки эритроцитных компонентов, доля замороженных эритроцитов в течение 2009–2013 гг. не превышала 3,70% (рис. 2). При этом за весь период наблюдения этот показатель снизился в 1,5 раза и в 2013 г. составил 2,54%.

В 2013 г. криоконсервирование эритроцитов в наибольшей степени было внедрено в производственную деятельность учреждений службы крови Сибирского и Центрального ФО (табл. 1). В минимальном объеме были заморожены эритроциты в учреждениях службы крови Северо-Кавказского ФО. Криоконсервирование эритроцитов осуществлялось в широком диапазоне температур (от -38 до -196 °C) с использованием отечественного и зарубежного оборудования и расходных материалов. В наибольшем количестве размороженная и отмытая эритроцитная взвесь использовалась для клинических целей в медицинских организациях Сибирского и Центрального ФО, в то время как в медицинских организациях Северо-Кавказского ФО количество декриоконсервированных эритроцитов в 2013 г. было наименьшим.

В целом, в 2013 г. в России более 45% всех замороженных эритроцитов производили учреждения службы

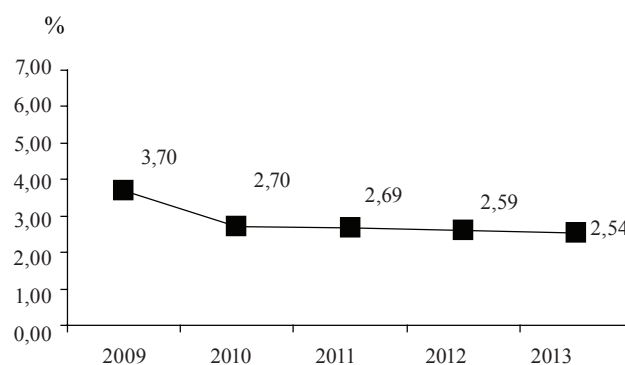


Рис. 2. Доля замороженных эритроцитов в структуре заготовки эритроцитных компонентов в России в 2009–2013 гг.

Таблица 1

Объем заготовки и выдачи криоконсервированных эритроцитов в службе крови России в 2013 г. (по федеральным округам)

Федеральный округ	Объем заготовки замороженных эритроцитов, доз	% от общего количества заготовленных эритроцитных компонентов
Северо-Западный ФО	1396	0,56
Южный ФО	4405	2,78
Северо-Кавказский ФО	762	0,87
Приволжский ФО	4767	1,24
Уральский ФО	3949	1,64
Сибирский ФО	22095	7,19
Дальневосточный ФО	3391	3,49
Центральный ФО	8043	2,03

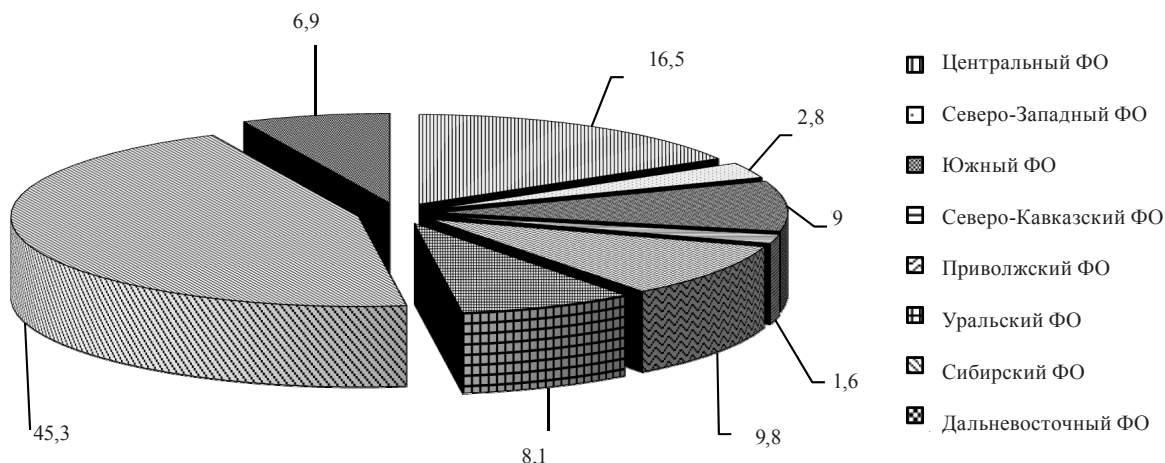


Рис. 3. Распределение количества замороженных эритроцитов по учреждениям службы крови ФО России в 2013 г

крови Сибирского ФО, 16,5% — учреждения службы крови Центрального ФО, 9,8% — Приволжского ФО (рис. 3).

На динамику показателей использования метода замораживания эритроцитов в службе крови России оказывали влияние различные факторы.

Внедрение методов криоконсервирования эритроцитов в производственную деятельность учреждений службы крови характеризуется увеличением материальных затрат, связанных с высокой стоимостью криогенного и холодильного оборудования, полимерных криоконтейнеров, криопротекторов и отмывающих растворов. Снижение затрат возможно за счет использования оборудования и расходных материалов отечественного производства, которые по своим медико-технологическим характеристикам не уступали бы зарубежным аналогам. Прежде всего, имеется острая потребность в современных хранилищах клеток крови, обеспечивающих автоматическое поддержание и контроль сверхнизкой температуры (до $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$), а также в низкотемпературных холодильниках (от -80 до $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$). Положительным примером в этом направлении является налаженное производство отечественного оборудования для размораживания криоконсервированных продуктов крови [8]. Важнейшим фактором внедрения криоконсервирования эритроцитов в службе крови является доступность расходных материалов, прежде всего криоконтейнеров, криоконсервирующих, отмывающих и ресуспендирующих растворов. В этом направлении в последние годы были интенсифицированы отечественные разработки, завершившиеся созданием полимерных криоконтейнеров для замораживания и хранения эритроцитов в диапазоне температур от -40 до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и комплектов соответствующих растворов [9, 10].

Важным фактором, влияющим на степень внедрения криоконсервирования эритроцитов в трансфузиологическую практику, является соблюдение требований инфекционной безопасности и качества декриоконсервированных эритроцитов. Потенциальное нарушение стерильности, вызванное дискретностью процесса отмывания и переносом размороженных эритроцитов в контейнер, сопряжено с риском бактериальной контаминации

трансфузионной среды и ограниченными сроками хранения декриоконсервированных эритроцитов перед трансфузией (до 1 сут). В настоящее время эта проблема решается путем проведения таких работ в чистых помещениях (ламинарных боксах), либо использованием автоматизированной функционально закрытой системы для глицеринизации и деглицеринизации Haemonetics АСР 215 [11]. При использовании автоматизированного процесса глицеринизации и деглицеринизации для производства размороженной отмытой эритроцитной взвеси при хранении при температуре $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ до 7 дней обеспечиваются показатели качества и безопасности, установленные международными и национальными стандартами [12].

Сотрудниками Российского НИИ гематологии и трансфузиологии были предложены методы криоконсервирования эритроцитов при ультранизких и умеренно низких температурах под защитой сниженной концентрации глицерина (15–20%), с оптимизированной методикой отмывания клеток, предусматривающей двукратное центрифугирование и использование солевых растворов на основе хлорида натрия в убывающей концентрации — 3,2%; 2,0% и 0,9% без применения фосфатов. Метод криоконсервирования для ультранизких температур с уменьшением циклов центрифугирования (с 3-х до 2-х) позволил снизить суммарные потери клеток при их деглицеринизации с $4,3\pm 0,29\%$ (метод ЦНИИГПК) до $3,2\pm 0,37\%$, а также уменьшить содержание осмотически неустойчивых клеток — с $2,0\pm 0,17\%$ до $1,1\pm 0,2\%$ соответственно [13]. Кроме того, предложенные методы имели преимущества перед разработанными ранее по экономичности и простоте, поскольку позволили отказаться от больших объемов отмывающих растворов и использования дорогостоящих маннита (16%) и сахарозы (30%).

В дальнейшем в Российском НИИ гематологии и трансфузиологии были проведены пилотные исследования по увеличению сроков хранения размороженных эритроцитов, криоконсервированных при ультранизких и умеренно низких температурах, путем отсроченного отмывания от глицерина размороженных клеток. В результате исследования установлено, что размороженные, отмытые и ресуспендированные в ЦНИИГПК₈ эри-

троциты на седьмой день хранения при 4 °С, вследствие высоких уровней свободного гемоглобина, внеклеточного калия, повышения количества осмотически неустойчивых клеток, снижения содержания АТФ, становились непригодными для переливания. В то же время при отсроченном отмывании (через 7 и более сут хранения при 4 °С) размороженные деглицеринизированные эритроциты по изученным показателям практически не отличались от исходных, а по степени гемолиза превосходили красные клетки, отмываемые сразу после размораживания. Следовательно, при необходимости хранения размороженных эритроцитов очевидны преимущества отсрочки их отмывания — не в день размораживания, а непосредственно перед переливанием [14]. Данные исследования будут продолжены, их результаты целесообразно оформить в виде методических рекомендаций с целью внедрения в практику службы крови.

Для повышения безопасности декриоконсервированных эритроцитов сотрудниками Российского НИИ гематологии и трансфузиологии разработана новая медицинская технология — «Технология заготовки и создания запасов лейкофильтрованных карантинизированных эритроцитов для обеспечения иммунологической и инфекционной безопасности их трансфузий» (ФС № 2011/177 от 30.06.2011). Данная технология лейкофильтрации через фильтры, в основном отечественного производства, с последующим криоконсервированием эритроцитов при умеренно низких температурах (— 38±2 °С) и их карантинизация доступны для широкой практики. Доказана эффективность лейкодеплеции и сохранность морфофункциональных свойств лейкофильтрованных эритроцитов после их размораживания и отмывания через 6 мес хранения: содержание свободного гемоглобина в готовой к трансфузии взвеси составляло в среднем 0,68±0,194 г/л; показатель гематокрита — 35,7±3,03%; содержание АТФ — 4,37±0,109 мкМ/г Нв, морфологический индекс — 95,7±0,77, содержание осмотически неустойчивых эритроцитов — 1,2±0,09%, что в положительную сторону отличалось от соответствующих показателей нефилтрованных размороженных и отмываемых красных клеток. Фактический выход конечного продукта (взвесь эритроцитов в ресуспендирующем растворе) составил 271,6±5,99 мл, содержание гемоглобина в полученной дозе — 40,7±0,87 г. Показана клиническая эффективность их трансфузий (средний прирост гемоглобина у реципиента через сутки после трансфузии двух доз среды составил 19,3±2,73 г/л).

Доказана также сохранность морфофункциональных свойств предварительно лейкофильтрованных эритроцитов при использовании метода криоконсервирования при —196 °С. Лейкофильтрованные карантинизированные эритроциты представляются оптимальным средством гемокомпонентной 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 [15–17].

Наметившиеся в последние годы существенные предпосылки для развития криоконсервирования эритроцитов в службе крови, обусловленные оснащением

станций и отделений переливания крови оборудованием для замораживания и длительного хранения эритроцитов в рамках реализации программы развития службы крови России, расширением отечественного производства полимерных криоконтейнеров, криоконсервирующих, отмывающих и ресуспендирующих растворов, позволят повысить использование криоконсервированных эритроцитов в трансфузиологической практике.

Заключение

В течение 2009–2013 гг. в службе крови России наблюдалось постепенное уменьшение доли замороженных эритроцитов в структуре заготовки эритроцитных компонентов и, как следствие, снижение объема трансфузий декриоконсервированных эритроцитов. Намечившееся в 2013 г. увеличение количества замороженных эритроцитов в учреждениях службы крови, а также разработка новых технологий и модернизация службы крови, проводимая в рамках целевой программы, позволят внести положительные тенденции в развитие криоконсервирования эритроцитов на станциях (центрах крови) и отделениях переливания крови в субъектах Российской Федерации.

Список литературы

1. Четкин А. В., Вильянинов В. Н., Калеко С. П. и др. Организационные аспекты применения низкотемпературных технологий в современной производственной трансфузиологии // Вестник Международной академии холода. 2005. № 2. С. 34–39.
2. Селиванов Е. А., Четкин А. В., Григорьян М. Ш., Макеев А. Б. Состояние и проблемы криоконсервирования эритроцитов в службе крови Российской Федерации // Трансфузиология. 2012. № 2. С. 14–20.
3. Уйба В. В. Программа развития — исторический шанс для службы крови // Трансфузиология. 2009. Т. 13. № 2. С. 4–13.
4. Грачев А. Е., Накостоев И. М., Грибанова Е. О. и др. Клиническая эффективность трансфузий криоконсервированных эритроцитов различной длительности хранения // Гематол. и трансфузиол. 2014. Т. 59, № 1. С. 87.
5. Вильянинов В. Н., Калеко С. П., Багаутдинов Ш. М. и др. Резервирование компонентов крови и гемопоэтических клеток с использованием низких температур: состояние и перспективы внедрения в интересах обеспечения пострадавших в чрезвычайных условиях // Вестник Международной академии холода. 2014. № 4. С. 48–53.
6. Багаутдинов Ш. М., Вильянинов В. Н. и др. Влияние глубокого замораживания на клеточную структуру эритроцитов человека. // Вестник Международной академии холода. 2014. № 2. С. 41–44.
7. Четкин А. В., Хубулава Г. Г., Матвеев С. А., Вильянинов В. Н. Аутогемотрансфузии в хирургической практике // Эфферентная терапия. 2004. Т. 10, № 3. С. 87–92.
8. Гудков А. Г., Онуфриевич А. Д., Каюмова Л. И. и др. Размораживатель криоконсервированных продуктов крови «Плазмотерм-4»: решение проблемы обеспечения точности процесса термообработки // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2007. № 6. С. 39–43.
9. Вильянинов В. Н., Ващенко В. И., Куркова М. В. и др. Консервирование эритроцитов человека при умеренно низкой

- температуре -80°C в полимерных контейнерах ОАО «Синтез» // Вестник службы крови России. 2011. № 1. С. 17–22.
10. Багаутдинов Ш. М., Копелец А. В., Четкин А. В. и др. Использование новых полимерных криоконтейнеров для замораживания эритроцитов при ультранизкой температуре // Гематол. и трансфузиол. 2009. № 1. С. 25.
 11. Sareneva I. M., Haimila K. E., Korhonen A. E. et al. Use of frozen red blood cell units in Finland // *Vox Sang.* 2013. Vol. 105, Suppl. 1. P. 123–124.
 12. Hansen A., Yi Q. L., Acker J. P. Quality of red blood cells washed using the ACP 215 cell processor: assessment of optimal pre- and postwash storage times and conditions // *Transfusion.* 2013. Vol. 53, № 8. P.1772–1779.
 13. Мельникова В. Н., Замалетдинова Т. В., Кирьянова Г. Ю. Модифицированный способ деглицеринизации размороженных эритроцитов, криоконсервированных в жидком азоте // Гематол. и трансфузиол. 1996. Т. 41, № 1. С. 39–41.
 14. Мельникова В. Н., Замалетдинова Т. В., Кирьянова Г. Ю. Пролонгированное хранение при температуре 4°C криоконсервированных и размороженных эритроцитов // Гематол. и трансфузиол. 1995. Т. 40, № 3. С. 29–32.
 15. Мельникова В. Н., Селиванов Е. А., Кирьянова Г. Ю. и др. Значение лейкофилтрации при криоконсервировании эритроцитов с целью их карантинизации // Вестник службы крови России. 2010. № 4. С. 3–7.
 16. Li T.-D., Gao J., Szoszkiewicz R. et al. Structured and viscous water in subnanometer gaps // *Phys. Rev.* 2007. Vol. 75. P. 115–415.
 17. Ebner A., Schillers H., Hinterdorfer P. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy // *Methods Mol Biol.* 2011. Vol. 736. P. 223–241.
 5. Vilyaninov V. N., Kaleko S. P., Bagautdinov Sh. M. et al. Reserve components of the blood and hematopoietic cells using low temperatures: the state and prospects of implementation in the interests of victims in emergency conditions. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda.* 2014. No 4. P. 48–53. (in Russian)
 6. Bagautdinov Sh. M., Vilyaninov V. N. et al. Influence of deep freezing on cellular structure of the human red blood cells. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda.* 2014. No 2. p. 41–44. (in Russian)
 7. Chechetkin A. V., Hubulava G. G., Matveev S. A., Viljanino v V. N. Autohemotransfusions in surgical practice. *Efferent Therapy.* 2004. Vol.10., No 3. P. 87–92. (in Russian)
 8. Gudkov A. G., Onufrievich A. D., Kayumova L. I. et al. Defroster cryopreserved blood products «Plasmoterm-4»: ensure the accuracy of the process heat treatment. *Biomedical technologies and radioelectronics.* 2007. No 6. P. 39–43. (in Russian)
 9. Vilyaninov V. N., Vashchenko V. I., Kurcova M. V. et al. Cryopreservation of human erythrocytes at low temperature -80°C in polymeric containers of ОАО «Synthesis». *Vestnik of the blood service of Russia.* 2011. No 1. P.17–22. (in Russian)
 10. Bagautdinov Sh. M., Copelets A. V., Chechetkin A. V. et al. Use of new polymer cryo containers for freezing red blood cells at ultra-low temperature. *Gematologiya i Transfuziologiya.* 2009. Vol. 54, No 1. P.25. (in Russian)
 11. Sareneva I. M., Haimila K. E., Korhonen A. E. et al. Use of frozen red blood cell units in Finland. *Vox Sang.* 2013. Vol. 105, Suppl. 1. P. 123–124.
 12. Hansen A., Yi Q. L., Acker J. P. Quality of red blood cells washed using the ACP 215 cell processor: assessment of optimal pre — and postwash storage times and conditions. *Transfusion.* 2013. Vol. 53, No 8. P. 1772–1779.
 13. Melnikova V. N., Zhamaletdinova T. V., Kiryanova G. Yu. Prolonged storage at $+4^{\circ}\text{C}$ of cryopreserved and defrosted erythrocytes. *Gematologiya i Transfuziologiya.* 1995. Vol. 40, No 3. P. 29–32. (in Russian).
 14. Melnikova V. N., Zhamaletdinova T. V., Kiryanova G. Yu. A modified method of deglycerinization of defrosted red blood cells, cryopreserved in liquid nitrogen. *Gematologiya i Transfuziologiya.* 1996. Vol. 41, No 1. P. 39–41. (in Russian)
 15. Melnikova V. N., Selivanov E. A., Kiryanova G. Yu. et al. The value of leukofiltration in cryopreservation of red blood cells for the purpose of their quarantine. *Vestnik of the blood service of Russia.* 2010. No 4. P. 3–7. (in Russian).
 16. Li T.-D., Gao J., Szoszkiewicz R. et al. Structured and viscous water in subnanometer gaps. *Phys. Rev.* 2007. Vol. 75. P. 115–415.
 17. Ebner A., Schillers H., Hinterdorfer P. Normal and pathological erythrocytes studied by atomic force microscopy. *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 736. P. 223–241.

References

1. Chechetkin A. V., Vilyaninov V. N., Kaleko S. P. et al. Organizational aspects of the application of low-temperature technology in modern production transfusiology. *Vestnik Mezhdunarodnoi akademii kholoda.* 2005. No.2. P. 34–39. (in Russian)
2. Selivanov E. A., Chechetkin A. V., Grigorian M. W., Makeev A. B. State and problems of cryopreservation of red blood cells in the blood service of the Russian Federation. *Transfusiology.* 2012. No.2. P.14–20. (in Russian)
3. Uyba V. V. Program development is a historical chance for the blood service. *Transfusiology.* 2009. Vol.13, No 2. P. 4–13. (in Russian)
4. Grachev A. E., Nakostoev I. M., Gribanova E. O. et el. Clinical efficacy of transfusions of cryopreserved erythrocytes of different storage durations. *Gematologiya i Transfuziologiya.* 2014. Vol.59, suppl.1. P. 87. (in Russian)

Статья поступила в редакцию 04.03.2015