

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы  
«Научно–исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского  
Департамента здравоохранения города Москвы»

На правах рукописи

Высочин Игорь Валерьевич

**ОСОБЕННОСТИ ЗАГОТОВКИ И КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ  
ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

Специальность: 14.01.21 «Гематология и переливание крови»

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Хватов Валерий Борисович

Москва, 2019

## Оглавление

Введение.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель и задачи исследования.....	7
Научная новизна работы.....	7
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту.....	11
Степень достоверности и апробации результатов.....	12
Публикации.....	14
Объем и структура диссертации.....	14
Основная часть.....	15
Глава 1. Обзор литературы.....	15
1.1 Современные способы криоконсервирования тромбоцитов.....	15
1.2 Токсическое действие диметилсульфоксида при внутривенном введении.....	23
1.3 Методы контроля качества криоконсервированных тромбоцитов.....	26
1.4 Клиническое применение тромбоцитных компонентов.....	29
1.5 Иммунологическая совместимость донорских тромбоцитов с реципиентами.....	35
Глава 2 Материалы и методы исследования.....	37
2.1 Объем и дизайн исследования качества тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов, а также их клинической эффективности.....	37
2.2 Заготовка и хранение тромбоцитных концентратов.....	41
2.3 Морфофункциональный анализ тромбоцитов.....	41
2.4 Определение рН и осмолярности в тромбоцитных концентратах и криоконсервированных тромбоцитах.....	43
2.5 Цитометрия тромбоцитов.....	43

2.6 Методы криоконсервирования тромбоцитов.....	44
2.7 Определение концентрации диметилсульфоксида в криоконсервированных тромбоцитах.....	46
2.8 Определение иммунологической совместимости тромбоцитных концентратах и криоконсервированных тромбоцитах с реципиентами.....	46
2.9 Оценка эффективности трансфузии тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов.....	48
2.10 Статистический анализ.....	49
Глава 3. Морфофункциональный анализ тромбоцитов в крови доноров и в тромбоцитных концентратах, используемых в клинической практике.....	50
3.1 Концентрация и активность тромбоцитов в крови доноров и в тромбоцитных концентратах.....	50
3.2 Оценка качества тромбоцитов доноров с учетом гендерных различий.....	53
3.3 Анализ качества тромбоцитов в процессе хранения тромбоцитных концентратах.....	55
Глава 4. Разработка способа криоконсервирования тромбоцитов с учетом морфофункциональных характеристик клеток.....	57
4.1 Оценка эффективности существующих способов криоконсервирования тромбоцитов.....	57
4.2 Влияние различных концентраций диметилсульфоксида и времени экспозиции на качество тромбоцитов.....	59
4.3 Обоснование к совершенствованию метода криоконсервирования тромбоцитов.....	61
4.4 Влияние качества исходных тромбоцитных концентратов на сохранность тромбоцитов после криоконсервирования.....	63
4.5 Оценка рН и осмолярности в исходных тромбоцитных концентратах и в криоконсервированных тромбоцитах после размораживания.....	66
4.6 Разработка устройств для криоконсервирования тромбоцитов.....	67

4.7	Разработка устройства для подготовки криоконсервированных тромбоцитов к трансфузии.....	68
4.8	Принципы автоматизации производства криоконсервированных тромбоцитов.....	70
4.9	Принцип разработанного метода криоконсервирования тромбоцитов.....	71
4.10	Объем производства и потребность ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» в тромбоцитных концентратах и криоконсервированных тромбоцитах.....	73
	Глава 5. Оценка клинической эффективности и безопасности применения криоконсервированных тромбоцитов у больных с хирургической патологией.....	76
5.1	Оценка качества тромбоцитов у больных до трансфузии тромбоцитных концентратов.....	76
5.2	Примеры клинического использования тромбоцитных концентратов.....	78
5.3	Оценка клинической эффективности криоконсервированных тромбоцитов.....	81
5.4	Карантинизация криоконсервированных тромбоцитов для обеспечения инфекционной безопасности гемокомпонентной терапии.....	84
5.5	Клиническое применение криоконсервированных тромбоцитов в лечебно-профилактических учреждениях Владимирской и Тюменской области.....	85
5.6	Влияние индивидуальной совместимости тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов с реципиентами на их клиническую эффективность.....	89
	Глава 6. Обсуждение.....	96
	Заключение.....	110
	Выводы.....	112
	Практические рекомендации.....	114
	Список сокращений и условных обозначений.....	116
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118
	Приложения.....	136

## Введение

### Актуальность темы исследования

Тромбоцитные компоненты интенсивно используют для лечения больных в трансплантологии, кардиохирургии, реаниматологии, гепатологии, гематологии, акушерстве и гинекологии, в педиатрии и неонатологии, хирургии, травматологии [11, 13, 33, 49, 61, 79, 101]. В последние два десятилетия наблюдается устойчивый рост потребности в тромбоцитных концентратах (ТК), как в Российской Федерации [10, 30], так и за рубежом [61, 79, 101]. Трансфузии ТК позволяют останавливать кровотечение у пациентов с тромбоцитопенией и тромбоцитопатией, способствуют разработке и совершенствованию интенсивных лечебных программ во многих областях медицины [49]. При этом заготовка тромбоцитов и их дальнейшее использование сопряжены с известными трудностями. Во-первых, по существующим нормативным документам (НД) хранение ТК не должно превышать 5 суток, что делает невозможной карантинизацию ТК и создает риск передачи гемотрансмиссивных инфекций в условиях серонегативного окна. Во-вторых, возрастающая потребность в тромбоцитах требует создания банков ТК, типированных по системе АВ0, HLA и HPA [43]. Решением этих проблем может быть разработка и внедрение методик длительного хранения тромбоцитов. На сегодняшний день наиболее реализуемым направлением является криоконсервирование (КК) тромбоцитов, т.е. хранение ТК при ультранизких температурах с использованием криопротекторов (КП). Разработка методов КК тромбоцитов ведется с 60-х годов XX-го века, однако до сих пор не предложено стандартных критериев по КК тромбоцитов. КП на основе диметилсульфоксида (ДМСО) считаются «золотым стандартом» для криохранения клеток человека, однако в случае тромбоцитов методика использования ДМСО до сих пор не оптимизирована. Неоднократно показано, что при одном и том же способе КК тромбоцитов с ДМСО сохранность функционально активных тромбоцитов (ФАТ) в криоконсервированных

тромбоцитах (КТК) может значительно варьировать [61, 85]. В результате сохранность ФАТ в КТК в среднем составляет лишь 30-33% от исходного уровня [148], доля неэффективных трансфузий КТК нередко превышает 50% [146]. Во многом трудности обусловлены отсутствием адекватного анализа качества тромбоцитов – как в составе ТК до и после КК, так и в циркулирующей крови самого пациента. В настоящее время для лабораторной оценки эффективности трансфузий ТК используется только один параметр – скорректированный прирост (СПТ) через 1 и 24 часа после окончания трансфузии – рассчитанный с учетом антропометрических данных реципиента и дозы ТК [29]. СПТ никак не отражает структурную целостность и функциональную активность перелитых тромбоцитов в крови, что не позволяет адекватно корректировать трансфузионную тактику, не позволяет прогнозировать возможное развитие повторных кровотечений.

Таким образом, эффективность трансфузии тромбоцитных компонентов зависит как от исходного качества тромбоцитов, так и от возможности оперативно проводить мониторинг их качества в ТК и в крови пациента. С другой стороны, КК ТК без оценки качества тромбоцитов не позволяет добиться высокой сохранности клеток в составе ТК. В связи с этим актуальным является разработка способа КК тромбоцитов, включающая оценку их морфофункциональных характеристик.

### **Степень разработанности темы исследования**

Несмотря на большое количество работ по КК тромбоцитов [61, 79, 102, 117, 127] до сих пор не было предложено адекватной методики оценки качества тромбоцитов до и после КК. Широко распространено использование подходов, разработанных R.Valeri с соавт. [170]. Однако данная технология не автоматизирована, не содержит специальных устройств для криоконсервации тромбоцитов. Кроме того, используемые в этой технологии медицинские изделия и расходные материалы не разрешены для медицинского использования на

территории РФ, что ограничивает использование КТК как в гражданской, так и в военной медицине в РФ.

### **Цель исследования**

Разработать способ криоконсервирования тромбоцитов для клинического применения на основе оценки морфофункционального состояния тромбоцитов.

### **Задачи исследования**

1. Оценить морфофункциональное состояние тромбоцитов в крови доноров и в тромбоцитных концентратах на разных сроках хранения.
2. Разработать способ и устройства для криоконсервирования тромбоцитов.
3. Определить параметры качества тромбоцитных концентратов, влияющие на сохранность тромбоцитов после размораживания.
4. Оценить инфекционную безопасность и клиническую эффективность тромбоцитных компонентов.
5. Разработать новый критерий эффективности трансфузии тромбоцитных компонентов.
6. Обосновать эффективность индивидуального подбора и трансфузий иммунологически совместимых тромбоцитных компонентов реципиентам.

### **Научная новизна работы**

Впервые показано распределение доноров крови и ТК по уровню ФАТ. Выявлены 3 популяции доноров: основная (58% доноров) с уровнем ФАТ от 45 до 60% (основная группа), популяция с невысоким уровнем ФАТ (от 35 до 44%,) и популяция с высоким уровнем ФАТ (от 61 до 75%). ТК имеют аналогичное распределение по уровню ФАТ. В процессе хранения ТК при температуре от 20

до 24 °С и непрерывном помешивании содержание ФАТ значимо не снижается в течение первых 2-х суток хранения.

Разработан способ КК тромбоцитов с учетом оценки морфофункциональной активности клеток, включающий морфофункциональный анализ тромбоцитов до и после КК, использование комбинированного КП CryoSure-DEX 40 на основе ДМСО и декстрана 40, разделение ТК на тромбоцитсодержащую часть и бесклеточную плазму, введение КП в тромбоцитсодержащую часть ТК до конечной концентрации ДМСО 5-6%, заморозку и криохраниение тромбоцитсодержащей части и бесклеточной плазмы при ультранизких температурах, одновременную разморозку тромбоцитов и плазмы ТК, дилуцию размороженных тромбоцитов (РТ) с помощью плазмы того же ТК. Разработано устройство для КК тромбоцитов и устройство для подготовки КТК к трансфузии. Сохранность ФАТ в КК предложенным способом ТК, в среднем составляет 52% от всего количества ФАТ в исходных ТК.

Впервые исследовано влияние исходного морфофункционального статуса тромбоцитов на сохранность ФАТ в процессе КК. Наиболее высокая сохранность ФАТ отмечена в ТК, где общее содержание тромбоцитов исходно составляло 200-250  $\times 10^9$ /дозе, относительное содержание ФАТ – 50-75%, общее содержание ФАТ – 100-180  $\times 10^9$ /дозе. В таких ТК сохранность ФАТ варьировала от 40 до 70%, составляя в среднем 52%. Показано, что сохранность ФАТ в ТК зависит от сроков предварительного хранения ТК при температуре от 20 до 24 °С: в ТК 1-х суток хранения сохранность ФАТ составила в среднем 63%, 2-х суток – 47%, 3-х суток – 25%, 4-х суток – 11%.

Заготовленные предложенным способом тромбоциты являются клинически эффективными. Клиническая коррекция геморрагического синдрома (ГС) отмечено в 70% случаев при трансфузии ТК и в 80% случаев при трансфузии КТК. Среднее значение ФАТ в крови пациента при трансфузиях КТК было такое же как, при переливании ТК 1-2-х суток хранения и был в 1,9-2,2 раза выше, чем при переливании ТК 3-4х суток хранения при 20-24 °С. Наиболее высокий

клинический эффект наблюдали при использовании ТК и КТК, содержащих от 80 до  $140 \times 10^9$  ФАТ в дозе.

Разработан новый параметр оценки эффективности трансфузии ТК – скорректированный прирост ФАТ (СП ФАТ) – который позволяет определить прирост не только общего количества тромбоцитов, но и ФАТ в крови больного с учетом его антропометрии, а также количества ФАТ в дозе перелитых ТК. СП ФАТ является объективным показателем коррекции тромбоцитопении. Определены минимальные значения СП ФАТ в крови больного через 1 час и 24 часа после трансфузии ТК, рассчитанные с учетом антропометрии больного и количества ФАТ в дозе ТК. Для эффективной коррекции тромбоцитопении скорректированный прирост ФАТ через 1 час должен составить не менее  $27 \times 10^9/\text{л}$ , а через 24 часа  $23 \times 10^9/\text{л}$ .

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Разработан новый способ и устройства для КК тромбоцитов, защищенные 6 патентами на территории РФ.
2. Разработана и утверждена Стандартная операционная процедура «Способ криоконсервирования тромбоцитов» утверждена в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» 05.06.2015 г.
3. Разработанный способ с использованием устройств внедрен в производство КТК в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» (Справка о внедрении от 19 апреля 2016 г.) (Приложение К).
4. Разработанный способ внедрен в производство КТК в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Владимирской области «Областная станция переливания крови» (ГБУЗ ВО ОСПК) (Лицензионный договор на использование изобретения, полезной модели № 155 от 14 декабря 2017 г.; уведомление о регистрации лицензионного договора с ГБУЗ ВО ОСПК (Приложение Е); Акт о внедрении технологии КК тромбоцитов от 17 января 2018 г. № 24 (Приложение З)).

5. Разработанный способ внедрен в производство КТК в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения Тюменской области «Областная станция переливания крови» (ГБУЗ ТО «ОСПК») (Лицензионный договор на использование изобретения, полезной модели № 153 от «13» декабря 2017 г.; уведомление о регистрации лицензионного договора с ГБУЗ ТО «ОСПК» (Приложение Ж); Акт о внедрении технологии КК тромбоцитов от 16 января 2018 г. № 0017 (Приложение И)).
6. Показана высокая клиническая эффективность КТК, приготовленных по разрабатываемой технологии и не уступающих по своему качеству ТК первых двух суток хранения.
7. Предложен новый способ оценки эффективности трансфузии ТК и КТК, позволяющий прогнозировать риск последующего кровотечения и необходимость трансфузионной коррекции клеточного звена гемостаза.

### **Методология и методы исследования**

Основой диссертационного исследования послужили труды как отечественных, так и зарубежных исследователей в области трансфузиологии и гематологии, посвященные проблеме КК тромбоцитов. В работе применены как общенаучные, так и специальные методы научного познания. В качестве общенаучных методов использованы: метод восхождения от абстрактного к конкретному, метод наблюдения, метод индукции и дедукции. С помощью метода восхождения от абстрактного к конкретному, сформирована схема разрабатываемой технологии получения КТК. Методом наблюдения описана клиническая эффективность ТК и КТК, а также проведена карантинизация КТК и выбраковка задержанных по трансмиссивным инфекциям гемокомпонентов. Методом индукции, на основе полученных результатов экспериментов, получены новые теоретические знания о том, что основой клинической эффективности ТК и КТК является не количество тромбоцитов, а их морфофункциональные свойства. Метод дедукции позволил теоретически обосновать выводы, полученные экспериментальным путем. Помимо общенаучных в работе использованы

специальные методы исследования: морфометрия, микроскопия, цитометрия, биофизические (осмометрия, рН-метрия, газовая хроматография), биохимический, изосерологический, ПЦР-исследование, клинические методы обследования больных и статистические. С помощью специальных методов проведена оценка качества тромбоцитов в крови доноров и больных, во время хранения ТК, а также при анализе качества КТК до и после КК. Методами параметрической (критерий Стьюдента) и непараметрической статистики (критерий Манна-Уитни) проведена оценка различий между сравниваемыми выборками.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. В ходе исследования выявлена высокая вариабельность тромбоцитов по количеству ФАТ в крови доноров ТК.
2. Разработан способ и устройства для КК тромбоцитов с учетом оценки морфофункциональной активности клеток.
3. Выявлено, что сохранность функциональной активности ТК после КК зависит от исходных морфофункциональных характеристик тромбоцитов.
4. Определены критерии, которые определяют качество ТК после КК: общее содержание тромбоцитов исходно составляло  $200-250 \times 10^9$ /дозе, относительное содержание ФАТ – 50-75%, общее содержание ФАТ –  $100-180 \times 10^9$ /дозе.
5. Показано, что высокая клиническая эффективность ТК и КТК определяется содержанием ФАТ от 80 до  $140 \times 10^9$  в дозе.
6. Разработан новый параметр оценки эффективности трансфузии ТК – СП ФАТ – который позволяет определить прирост ФАТ в крови больного с учетом его антропометрии, а также количества ФАТ в дозе перелитых ТК. Для эффективной коррекции тромбоцитопении СП ФАТ через 1 час должен составить не менее  $27 \times 10^9$ /л, а через 24 часа  $23 \times 10^9$ /л.

## Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов исследований и обоснованность выводов, подтверждается использованием соответствующей методологии, достаточным объемом научной литературы, эмпирическими данными, полученными в процессе работы над диссертационным исследованием.

Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на 22 отечественных и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах:

1. Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2011 г., устный доклад);
2. X научно-практическая конференция «Внутрибольничные инфекции в стационарах различного профиля, профилактика, лечение осложнений» (Москва, 2012 г., устный доклад);
3. VI научно-практическая конференция «Современная гематология. Проблемы и решения» (Москва, 2012 г., устный доклад);
4. VI научно-практическая конференция «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ» (Москва, 2013 г., устный доклад);
5. Ежегодная научно-практическая конференция Центрального федерального округа РФ совместно с 22-й конференцией Московского общества гемафереза «Актуальные вопросы нефрологии, диализа, хирургической гемокоррекции и гемафереза» (Москва-Углич, 2014 г., устный доклад);
6. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2014 г., устный доклад);
7. XIV съезд Федерации анестезиологов и реаниматологов (Казань, 2014 г., устный доклад);
8. Первая Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2015 г. устный доклад);

9. II ЕВРАЗИЙСКИЙ КОНГРЕСС «Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства крови» (Санкт-Петербург, 2016 г., устный доклад);
10. 34-й Международный Конгресс Международного общества переливания крови (Дубаи, 2016 г., стендовый доклад);
11. Всероссийская конференция, 3-й съезд врачей неотложной медицины (к 125-летию со дня рождения С.С. Юдина) «Оказание скорой медицинской и неотложной медицинской помощи раненым и пострадавшим при массовом поступлении» (Москва, 2016 г., устный доклад);
12. IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» (Санкт-Петербург, 2016 г., устный доклад);
13. II Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2016 г., устный доклад);
14. Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы трансфузиологии» (Хабаровск, 2017 г., устный доклад);
15. Санибель Симпозиум общества перфузиологов США (Форт-Майерс, США, 2017 г., устный доклад);
16. VII БЕЛОМОРСКИЙ СИМПОЗИУМ (Архангельск, 2017 г., устный доклад);
17. Съезд Американской ассоциации банков крови (Сан-Диего, 2017 г., стендовый доклад);
18. III Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2017 г., устный доклад);
19. III ЕВРАЗИЙСКИЙ КОНГРЕСС «Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства крови» (Астана, 2018 г., устный доклад);
20. 35-й Международный Конгресс Международного общества переливания крови (Торонто, 2018 г., стендовый доклад);
21. Съезд Американской ассоциации банков крови (Бостон, 2018 г., стендовый доклад);
22. IV Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2018 г., устный доклад).

Апробация диссертации состоялась на заседании Проблемно-плановой комиссии № 8 «Трансплантация клеток, тканей и органов» ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» от 26 декабря 2018 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 36 работ, из них 10 статей в журналах (6 в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ), 6 патентов РФ на изобретение и полезную модель, 19 тезисов в сборниках конференций, 1 глава в «Трансфузиология: национальное руководство».

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования; результатов собственных исследований (3-х глав), обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложения. Список литературы включает 173 источника, из них 57 отечественных и 116 зарубежных. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 15 рисунками.

Диссертационная работа выполнена в отделении клинической, производственной трансфузиологии и гравитационной хирургии крови (зав. отделением, к.м.н. А.И. Костин) под руководством д.м.н., профессора В.Б. Хватова в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1 Современные способы криоконсервирования тромбоцитов

В настоящее время ТК эффективно используют для лечения и профилактики геморрагических осложнений, обусловленных тромбоцитопенией или тромбоцитопатией [1, 18, 21, 77, 154]. Начиная с середины XX века, трансфузии ТК позволили обеспечить коррекцию тромбоцитопенических геморрагий, которые приводили к 60-70% летальности больных с гемобластомами [93, 98]. В начале XXI века отмечается бурный рост числа трансфузий ТК, что увеличило нагрузку на банки крови во всем мире [2, 48, 74]. Интенсивные трансфузии ТК позволили значительно снизить летальность у больных с тромбоцитопеническим ГС, который развивался на фоне гемобластозов, апластической анемии, злокачественных новообразований, лучевой болезни и т. д. Трансфузии ТК способствовали разработке высокотехнологичных лечебных программ в гематологии, онкологии, трансплантологии, что позволило проводить интенсивную высокодозную полихимиотерапию и оперативные вмешательства в сердечнососудистой хирургии, ортопедии, травматологии и т. д. [18, 71, 72, 147, 170].

Однако следует учитывать, что трансфузии ТК могут сопровождаться аллоиммунизацией и рефрактерностью больных к трансфузиям ТК, передачей опасных гемотрансмиссивных инфекций (вирусных гепатитов, ВИЧ и др.) [40, 59, 153, 162]. Для решения этих проблем могли бы быть использованы технологии КК и долгосрочного хранения тромбоцитов. Эти технологии дали бы возможность дополнительно обследовать донора на наличие возбудителей инфекционных заболеваний, исключить возможность бактериальной контаминации при хранении, создавать банки аутологичных ТК или HLA- и HPA-типированных аллогенных донорских ТК, транспортировать ТК длительное время на большие расстояния и т. д. [71, 147, 154].

Наличие банка с КТК может значительно облегчить обеспечение больных достаточным количеством ТК. Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что основной проблемой КК тромбоцитов является выбор КП, защищающего клетки от разрушения в процессе КК. Установлено, что гибель клетки при замораживании происходит в результате потерь клеточной воды или из-за образования внутриклеточного льда [122, 123, 158]. Согласно теории Н. Мегуман, при медленном замораживании и формировании льда во внеклеточном пространстве происходит концентрирование внеклеточных растворов и увеличение их осмотического давления. В результате возникшего осмотического градиента вода покидает клетку. Обезвоживание клетки и уменьшение ее объема приводят к повреждению мембраны. Наоборот, при быстром замораживании формируется внутриклеточный лед, разрушающий структуру клетки. Добавление КП к суспензии клеток увеличивает концентрацию растворимых веществ, что приводит к снижению точки замерзания и уменьшает количества льда, который образуется при субзамораживающих температурах [122]. Для того чтобы эффективно защищать клетки при замораживании КП должны быть нетоксичными для клеток и легко проникали в них. Большие концентрации КП способны значительно уменьшить количество образуемого льда и повреждение клеток дегидратацией. Однако известно, что тромбоциты, имеют низкую резистентность к неизотоническим условиям. В отличие от эритроцитов, которые выдерживают осмоляльность 1500 мОсмоль и более, тромбоциты начинают терять свои функциональные свойства уже при 800 мОсмоль [122, 123]. Введение и удаление КП обуславливает транзиторный гипер- и гипотонический эффект. Замораживание и размораживания приводит к существенным осмотическим перегрузкам в клетках. В связи с этим становится понятно, что тромбоциты КК труднее, чем другие клетки с более высокой осмотической резистентностью.

Исследования по созданию технологий КК тромбоцитов для клинической практики, за последние 50 лет, оказались не такими успешными, как в случае с другими клетками и тканями. В связи с низкой лечебной эффективностью (30–40% от соответствующего показателя для свежезаготовленных ТК) КТК пока

широко не применяют в лечебной практике [1, 71, 72, 147]. Анализ зарубежной литературы показал, что наиболее эффективным КП для КК и хранения КТК как при ультранизких, так и при умеренно низких температурах является ДМСО в конечной концентрации 4 — 6% [2, 69, 157, 170]. В качестве КП испытаны разные соединения – проникающие внутрь клетки (эндоцеллюлярные): диметилацетамид (ДМАЦ) [1, 2], глицерин [27, 69, 157], 1,2-пропандиол (1,2-ПД) [18, 20, 27, 64] – и не проникающие (экзоцеллюлярные - декстран, гидроксиэтилированный крахмал [157] и т.д.).

Вещество ДМСО обладает уникальными фармакологическими свойствами. Благодаря этому ДМСО нашел широкое применение в клинической практике для лечения ряда патологических состояний [113]. В основном, методы КК тромбоцитов с ДМСО согласуются между собой и указывают, что количественные потери клеток после размораживания составляют от 5 до 30% [25, 84, 170]. Результаты исследования качества КТК различными тестами показали, что ФАТ сохраняется на уровне 30—70% [2, 18, 20, 25, 42, 53, 57, 60, 61]. Клинические исследования КТК, меченных радиофармпрепаратом показали, что размороженные тромбоциты оказывают гемостатический эффект и рециркулируют в кровяном русле реципиента [53, 73, 149, 150, 151]. Некоторыми исследователями ДМСО признан наиболее эффективным КП для КК тромбоцитов [60, 118, 143]. Однако при КК большая часть тромбоцитов не жизнеспособна. Это показано в исследованиях *in vitro*, которые выявили: сниженную резистентность к гипотоническому стрессу после КК, низкую агрегационную активность на действие агонистов, ослабленную способность к поглощению серотонина и др. [71, 87, 128]. G.W. van Imhoff и соавт. было выявлено, что низкая агрегационная активность тромбоцитов, КК с ДМСО, является следствием дефицита в тромбоцитах содержимого плотных телец и альфа-гранул [71]. Также, тромбоциты после размораживания имели сниженную способность к секреции содержимого этих гранул. Определено 50%-ное падение количества цитозольной АТФ при незначительном уменьшении концентрации АДФ; а содержание связанных с гранулами АТФ и АДФ снижалось на 21 и 17 %, соответственно [71].

Т.к. морфологические исследования КТК показали, что около 40% клеток теряют форму диска, авторы предположили, что страдает не вся популяция тромбоцитов, а лишь ее часть. Подобные изменения выявлены в ТК, которые хранили при комнатной температуре; через 72 ч хранения содержание АТФ и АДФ уменьшилось на 27% и 34%, соответственно, в результате выходы содержимого плотных гранул [139].

Большое число исследований посвящено изучению криопротективных свойств глицерина при замораживании тромбоцитов. Глицерин имеет преимущество перед ДМСО, т.к. длительный опыт его применения для криоконсервирования эритроцитов показал безвредность для реципиентов. Исследования Р. Cohen и F. Gardner [82] продемонстрировали, что медленное замораживание тромбоцитов с 12% глицерином привело к значительным клеточным потерям и создало сложности при удалении глицерина из клеточной суспензии после размораживания тромбоцитов. С. Dayian и соавт. [90, 91] определили, что глицерин оказывает повреждающее действие на лизосомы тромбоцитов, которое усиливается при замораживании. Эти авторы установили, что глицерин, относительно медленно проникает внутрь тромбоцитов и уменьшает клетки в объёме [89]. Осмотический стресс, возникающий в момент контакта КП с клетками после размораживания, наиболее выражен при использовании его высоких концентраций, и обусловлен различиями в скорости прохождения воды внутрь тромбоцитов и выхода глицерина из тромбоцитов. Armitage W. и соавт. показал, что кинетика проникновения 5-гидрокситриптамина не нарушалась при инкубации тромбоцитов с 0,5 М глицерина [62]. Концентрации глицерина более высокие оказывали влияние на транспорт 5-гидрокситриптамина зависящее от времени. G. Dayian и A. Rowe [92], впервые разработали метод КК тромбоцитов с глицерином в конечной концентрации 5% для клинического применения. Замораживали ТК со скоростью не более 30<sup>0</sup>С/мин до температуры минус 80<sup>0</sup>С, затем хранили в жидком азоте. Оценка метода *in vitro* показала, что сохранность тромбоцитов после размораживания составила не более 70%. При этом по тестам поглощения серотонина и АДФ индуцированной агрегации показатели качества

тромбоцитов были близки к норме. Однако при повторном применении этого метода КК результаты значительно отличались. Так, Korbling M. и соавт. получили 70% сохранность клеток [73]. Velden K. и соавт. при сравнении методов КК тромбоцитов с ДМСО и глицерином обнаружили, что сохранность тромбоцитов по реакции на гипотонический стресс была близка к нулю [150]. Вероятно, нестабильность результатов, получаемых при использовании глицерина, является медленной диффузией через мембрану тромбоцитов, в связи с чем осмотический градиент, развивающийся во время введения и удаления КП, может быть более высоким и длительным. Armitage W. G. [63] представил данные о том, что тромбоциты толерантны к изменениям объема клетки в пределах от 30% до 40% от их физиологической величины. Группой исследователей [65, 69] при разработке методов КК тромбоцитов с применением КП глицерина и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) была установлена эффективная концентрация глицерина (1,4 М), поддерживающая при замораживании концентрацию натрия хлорид, не превышающую предельных для неё значений. Отработаны способы введения и отмывания глицерина, обеспечивающие поддержание физиологического объема клеток в пределах величин, к которым они толерантны. В результате исследований была разработана методика замораживания тромбоцитов с КП, содержащим 1,4 М глицерина, обеспечивающая удовлетворительную сохранность клеток по количественным и качественным параметрам после КК. Так, реакция на гипотонический стресс тромбоцитов сохранилась в среднем почти на 50% и была в 3,5 раза выше, чем при замораживании тромбоцитов с 0,5 М глицерина. Однако при воспроизведении методики для рутинного КК лечебных доз ТК в банках крови могут возникнуть трудности, связанные со сложностью многоэтапной методики добавления КП в ТК и его удаления после оттаивания.

Большой интерес представляли работы этих же авторов по КК тромбоцитов с использованием КП на основе 1,2-ПД [66-68]. Это вещество нетоксично, скорость его проникновения в тромбоциты в 100 раз больше чем у глицерина. Установлены предельно допустимые концентрации 1,2-ПД, не оказывающие токсического влияния на функцию тромбоцитов, отработан метод введения КП в суспензию

тромбоцитов и удаления из нее, не вызывающий значимых изменений объема клеток. Авторы оценили эффективность этого КП при замораживании тромбоцитов в жидком азоте. Проведена оценка эффективности концентраций КП в диапазоне от 0,5 до 2,5 М и скорости охлаждения от 0,4 до 100 °С/мин. Полученные результаты оказались очень скромными – АДФ-индуцированная агрегация не превышала 6%. Эти результаты были получены при использовании 1,2-ПД 0,5 М, скорости замораживания 14 °С/мин и быстром оттаивании (150 °С/мин). В результате проведенного исследования было сделано заключение, что токсичность 1,2-ПД резко повышается с увеличением его концентрации.

В качестве КП для КК тромбоцитов достаточно изучен ДМАЦ [1, 2, 18-21, 28, 57, 94]. Это вещество быстро проникает внутрь клетки и дает криозащитный эффект в низкой концентрации (2,5 %). Инструкция по КК тромбоцитов с ДМАЦ утверждена РФ в 1995 году. Однако КП «Тромбокриодмац», содержащий ДМАЦ, не зарегистрирован в РФ и не имеет разрешительных документов на медицинское использование. Сравнительное исследование криопротекторных свойств ДМАЦ и ДМСО *in vitro* и *in vivo* показало, что тромбоциты, КК с ДМСО, лучше сохраняются и дают больший СПТ после трансфузии ТК реципиенту по сравнению с ТК, КК с ДМАЦ [47].

Для КК тромбоцитов также испытаны и другие КП, в том числе экстрацеллюлярного типа, т.е. не проникающие в клетку. Использование последних может позволить исключить этап удаления КП из взвеси тромбоцитов после размораживания перед трансфузией. М. Taylor [157] провел сравнительные исследования *in vitro* 4 методов КК тромбоцитов: с ДМСО, глицерином, гидроксипропилкрахмалом (ГЭК) и декстраном. Полученные результаты показали, что ГЭК и декстран являются неэффективными КП для тромбоцитов. Наибольшая сохранность функциональных свойств тромбоцитов была обнаружена при КК с ДМСО.

Считается, что для улучшения количественных и качественных показателей КТК перспективно создание комбинаций экстрацеллюлярных и эндоцеллюлярных КП. Ветошкин с соавт., провели исследования по разработке комбинированного

КП для ТК на основе ГМБТОЭМ и ДМАЦ. Экспериментально подобранные соотношения этих компонентов позволили добиться наименьшего влияния КП на функциональные свойства тромбоцитов и их осмотическую устойчивость [42]. Результаты исследований, полученные Компаниец А.М. и соавт., показали преимущества КК тромбоцитов с комбинированными КП [18, 20, 27]. Сравнительный анализ свидетельствует о высоком уровне криозащитного действия комбинированных КП: ДМАЦ/ОЭГ, ДМАЦ/1,2-ПД и ДМАЦ/глицерин. Использование 5%-й концентрации каждого КП (10%-я суммарная концентрация) значительно повысило сохранность тромбоцитов после КК по сравнению с результатами КК тромбоцитов с моно-КП. Наибольшая сохранность тромбоцитов получена при использовании комбинированного КП, содержащего проникающий ДМАЦ и непроникающий ОЭК. Вместе с тем, данных о значительном преимуществе ДМСО по сравнению с другими КП не получено; отличия между значениями сохранности не превышали 7–15%. Кроме того, следует подчеркнуть, что для КП: ДМАЦ, 1,2-ПД и ОЭГ – установлены более высокие результаты сохранности ТК для 5–6%-х концентраций этих веществ в криозащитных растворах.

Из изложенного следует, что разработанные методы КК тромбоцитов для использования в клинической практике не столь эффективны. Вместе с тем интерес исследователей к этой сложной проблеме сохраняется [44, 64, 93], хотя он сконцентрирован на оптимизации условий замораживания тромбоцитов с ДМСО – “золотым стандартом” методов КК тромбоцитов [71, 85, 86, 146].

В настоящее время практически все страны мира используют метод КК, разработанный R. Valeri и соавт., который предусматривает использование 6% ДМСО и удаление его до замораживания [170]. Этот подход минимизирует токсичность ДМСО для пациента и уменьшает манипуляции после размораживания КТК. КТК замораживают и хранят при температуре минус 80°C. Напротив, Швейцария использует более высокую концентрацию ДМСО – 10% [172]. В отношении размораживания КТК между странами достигнут консенсус: КТК должны быстро размораживаться (10-30 мин) на водяной бане (30-37° С) и

ресуспендироваться в предварительно нагретой плазме (30-37°C) с легким перемешиванием. В Польше удаляют ДМСО путем отмывания тромбоцитов солевым раствором, содержащим витамин С [121]. В оригинальном протоколе R. Valeri и соавт. тромбоциты ресуспендируют в физиологическом растворе; однако, большинство специалистов предпочитают плазму АВ(IV) [168]. В Швейцарии же размораживают КТК при температуре 37°C и сразу переливают больным без удаления ДМСО [148]. В армии США используют небольшой объем нормального физиологического раствора для ресуспендирования КТК, размороженных при температуре 37°C [172].

Несмотря на достаточный опыт производства и клинического применения КТК во всем мире, методики КК тромбоцитов полностью не удовлетворяют современным требованиям по параметрам: функциональные свойства тромбоцитов в исходном ТК, до их КК; большая потеря тромбоцитов в результате удаления КП; низкая сохранность тромбоцитов после размораживания; посттрансфузионные токсические осложнения, к которым приводит переливание больному РТ без удаления КП; трудозатратность существующих технологий КК тромбоцитов.

Анализ литературы показал, что эмпирические модификации методов КК тромбоцитов, использующих ДМСО, ДМАЦ, ГЭК или глицерин, не приведут к их значительному улучшению и что более успешное КК не может быть достигнуто только с помощью эмпирических манипуляций КП и скоростями замораживания. Вероятно, необходимо методическое изучение ответных реакции достаточно чувствительных тромбоцитов на различные изменения окружающей среды, которые сопровождают технологию КК тромбоцитов. Оценка влияния осмотического стресса, химического токсического эффекта КП, поиск комбинаций КП с целью снижения их отрицательных действий и оказание влияния на процесс кристаллообразования, отработка оптимальных скоростей замораживания и оттаивания тромбоцитов помогут найти новые пути для разработки более эффективных способов КК тромбоцитов.

## 1.2 Токсическое действие диметилсульфоксида при внутривенном введении

ДМСО — бесцветная жидкость с сероподобным запахом. Он высокополярен и растворяет многие водо- и жирорастворимые вещества. Поскольку смешивание его с водой приводит к высвобождению тепла, ДМСО следует вводить в раствор КП и охлаждать смесь до ее добавления к клеточной суспензии. При внутривенном введении ДМСО могут возникнуть тошнота, рвота, местное сужение сосудов и ощущение вкуса и запаха чеснока [50].

Максимальная рекомендуемая доза ДМСО при внутривенном введении составляет 1 г/кг. Regan с соавт. сообщили, что токсичность ДМСО при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, как правило, минимальная и временная [145]. В связи с токсическими проявлениями ДМСО при клиническом использовании для замораживания клеток крови, Федотенковым А.Г. и соавт. были проведены токсикологические исследования на животных [52]. При трансфузии 400 мл размороженного костного мозга (содержание ДМСО - 10%) человеку весом 60 кг на 1 кг веса приходится 0,66 мл препарата. В пересчете на мышь весом 20 г доза ДМСО составляет 0,013 мл. При применении 10% раствора ДМСО (4-кратной дозы) на мышах в течение нескольких секунд после его введения наблюдали судороги. В печени и почках развивались очаговые некробиотические изменения. Реакций на введение 5% раствора ДМСО (2-кратная доза), равно как и патологических изменений, свидетельствующих о токсичности препарата, выявлено не было. При внутривенном введении собакам 0,6 мл/кг 10% ДМСО обнаружено его токсическое действие в виде некробиотических изменений в паренхиматозных органах, особенно в печени. В дозе 0,3 мл/кг токсическое действие не определяется, однако и при этой дозе у некоторых животных в печени отмечалась блокада ретикуло-эндотелиальной системы гемосидерином и образование агглюнационных тромбов в капиллярах — свидетельство гемолиза.

Помимо общетоксического действия ДМСО вызывает эмбриотоксичность и тератогенность после интраперитонеального введения беременным хомякам (100% ДМСО; 15 г/кг). Тератогенное действие ДМСО проявляется после введения его беременным крысам и мышам (50% ДМСО; 5-12 г/кг) [88]. Токсичность ДМСО определяется не только его концентрацией, но и техникой введения в организм. При введении 20% ДМСО-солевого раствора в вену хвоста здоровых крыс Sprague Dawley (250-300 gm), гемолиз и гематурия наблюдались в течение 1 часа после инъекции. Гемолиз и гематурия отсутствовали при введении 20% ДМСО-солевого раствора в яремную вену крыс. Эта разница объясняется быстрым разбавлением ДМСО при относительно высоком кровотоке в яремной вене по сравнению с веной хвоста [161].

Клиническое применение ДМСО в качестве КП подтвердило его токсическое действие при введении в организм, которое проявляется в виде тошноты, рвоты, лихорадки, озноба, приливов, одышки, гипоксемии, гипертензии, тахикардии, брадикардии, гематурии, головной боли. Премедикация жаропонижающими, препаратами антагониста гистамина и кортикостероидами способна снизить частоту и интенсивность инфузионных реакций. Также возможны тяжелые реакции: дыхательная недостаточность, тяжелый бронхоспазм, выраженная брадикардия с блокадой сердца или другие аритмии, остановка сердца, гипотензия, гемолиз, повышенная концентрация ферментов печени, энцефалопатия, потеря сознания. Многие из этих реакций связаны с объемом ДМСО. Снижение количества ДМСО уменьшает риск их возникновения, хотя даже малые дозы ДМСО могут вызывать идиосинкразические реакции. Фактическое количество ДМСО зависит от способа приготовления компонента для инфузии. При более высоких дозах ДМСО были зарегистрированы несколько случаев изменения психического состояния и кома.

ДМСО эффективно используется не только для КК ядерных клеток (гемопоэтических стволовых клеток), но и безъядерных – тромбоцитов. Для приготовления замороженных тромбоцитов в основном применяются два метода: один с использованием диметилсульфатоксида (ДМСО, 6% в/о), другой – с очень

низкой концентрацией глицерина (5% в/о) [41]. Перед использованием тромбоциты размораживают, отмывают и ресуспендируют в (аутологичной) плазме или в соответствующем добавочном растворе.

Удаление криофиликта не исключает, а только снижает риск развития или степень проявления токсичности ДМСО. Так Фефелова И.В. и др., сообщили, что остаточное количество ДМСО после двукратного отмывания, установленное с помощью газожидкостного хроматографа, составляло всего 0,05%. Несмотря на это, все переливания сопровождались запахом ДМСО в выдыхаемом реципиентами воздухе, а 33% инфузий вызывали у пациентов озноб и лихорадку [53].

Напротив, Djerassi и соавт., наблюдали, что нечастые инъекции малых доз криотромбоцитов (20 мл на введение) без удаления КП (концентрация ДМСО – 5%) не оказывали токсического действия на больных детей с тромбоцитопенией [137].

Специалистами РОНЦ им. Н.Н. Блохина предложена оригинальная методика замораживания тромбоцитов с использованием КП на основе ДМСО (доза 100% раствора ДМСО – 5-6 мл) [56]. Тромбоциты вводят больному сразу же после их размораживания струйно внутривенно без удаления КП. В большинстве случаев трансфузия размороженных тромбоцитов (РТ) хорошо переносится больными и не вызывает серьезных осложнений. В числе вероятных реакций - тошнота, затруднение дыхания, спастические боли в животе, брадикардия и гипотония покраснение кожи лица и шеи. Во время трансфузии размороженных клеток больному проводят стандартную десенсибилизирующую премедикацию кортикостероидными гормонами и антигистаминными препаратами для профилактики токсических, пирогенных и аллергических реакций.

Сравнительные исследования современных методик КК тромбоцитов - R. Valery с редукцией ДМСО до замораживания и Khugi S.F. с отмыванием от ДМСО и разведением плазмой после размораживания - показали низкое остаточное количество ДМСО: 600 мг и 400 мг, соответственно [84, 169]. В обоих случаях

такое остаточное количество значительно не влияло на качество тромбоцитов и не вызывало у больных токсического проявления ДМСО.

Таким образом, учитывая высокую токсичность ДМСО, перед введением клеток крови больному следует удалять избыток КП, выбирая при этом наиболее щадящие методы его удаления для снижения потерь клеток при отмывании.

### **1.3 Методы контроля качества криоконсервированных тромбоцитов**

Основные функции тромбоцитов в процессе остановки кровотечения - это адгезия к поверхности повреждения, агрегация тромбоцитов между собой и поддержание реакций плазменного звена свертывания крови. При этом для выполнения своих функций тромбоциты способны проходить через ряд необратимых изменений, называемых активацией [167]. В процессе активации происходит масштабная перестройка цитоскелета и изменение формы тромбоцитов, активация основного агрегационного рецептора – гликопротеина Пб/Ша, а также экзоцитоз гранул и экспонирование фосфатидилсерина на внешнем слое мембраны. В физиологических условиях активация происходит при прикреплении тромбоцитов к месту повреждения под действием агонистов, таких как коллаген, тромбин, АДФ и др. Однако, может происходить неспецифическая активация тромбоцитов в процессе забора крови, их выделения и дальнейшего хранения. Такие неспецифически активированные тромбоциты необратимо теряют возможность выполнять свои основные функции в процессе остановки кровотечения.

Неактивированные тромбоциты – клетки «покоя» или дискоциты – составляют большую часть тромбоцитов периферической крови здоровых людей. Для определения функциональной активности дискоцитов используют методы морфофункциональной оценки нефиксированных тромбоцитов. В клинической практике широко используют: метод агрегометрии, проточной цитометрии, способ оценки морфо-функционального статуса тромбоцитов человека [22, 46].

Методы агрегометрии позволяют определить лишь общую характеристику функциональной активности всей популяции тромбоцитов не оценивая содержание функционально активных клеток и их структурной целостности и имеют технические ограничения: отсутствие возможности анализа в бесплазменной среде, ограниченность анализа концентрацией тромбоцитов в пробе или малым объемом пробы [22].

Метод проточной цитометрии не позволяет оценить морфологию клеток. Однако использование антител, конъюгированных с различными флюорохромами, позволяет качественно и количественно оценить экспрессию различных маркеров на мембране клеток [100]: антитело CD62p (связывается с компонентом альфа-гранул, Р-селектином) – маркер выплеска альфа-гранул тромбоцитов; Annexin V (связывается с фосфатидилсерином) – маркер клеточной смерти; антитело PAC-1 (связывается с активной формой гликопротеина 2b3a – рецептора агрегации тромбоцитов) – маркер активации тромбоцитов.

В соответствие со специфической меткой тромбоциты характеризуются как: фосфатидилсеринположительные тромбоциты; PAC-1 положительные тромбоциты; CD62-положительные тромбоциты.

Во всем мире специфические показатели контроля качества КТК до и после КК включают как количественные, так и качественные параметры. До замораживания большинство лабораторий отслеживают объем гемоконцентрации, количество тромбоцитов и лейкоцитов, некоторые также измеряют pH [172]. В Чешской Республике и Бразилии определяют функцию тромбоцитов методами тромбоэластографии и агрегометрии [79]. В Сингапуре не только выполняют ТЭГ и определяют агрегацию тромбоцитов, но и измеряют средний объем тромбоцитов и концентрацию электролитов. Количество ДМСО в КТК тщательно отслеживается Нидерландами и Австралией [101, 115, 126]. В США и Бельгии изучают генерацию тромбина в качестве главного критерия качества в дополнение к количеству тромбоцитов и pH [111, 125]. Количество тромбоцитов после размораживания учитывается во всех странах, но только Австралия и Франция используют минимальное количество –  $2,0 \times 10^{11}$  тромбоцитов /дозе [112,

114, 115, 116, 124]. Согласно правилам Австралии, после размораживания КТК должно сохраняться не менее 40% от исходного количества тромбоцитов [115, 144]; в Польше рекомендуется – не менее 70% от исходного количества тромбоцитов [121]. В Испании и Швейцарии оценивают качество КТК по показателю прироста тромбоцитов в крови больных после трансфузии КТК. Значение рН определяется только в нескольких странах и должен быть больше 6,4 [116, 124, 125]. В Австралии дополнительно контролируется бактериальная контаминация после размораживания КТК [102, 115].

Наиболее пригодными для анализа качества клеток КТК представляются морфофункциональные методы исследования, поскольку определяемые в них параметры непосредственно отражают морфологию тромбоцитов, их структурную целостность, а также функциональную активность. Морфофункциональный анализ нефиксированных тромбоцитов можно проводить с помощью фазово-контрастной, флуоресцентной, интерференционной микроскопии, однако большинство известных методик не содержит прямого исследования функций тромбоцитов [31]. В 2011-2012 годах в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» был разработан способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов при витальном окрашивании клеток с помощью флуоресцентных красителей с последующей микроскопией. Разработанный краситель позволяет дифференцированно выявлять гранулы тромбоцитов, оценивать целостность тромбоцитарных мембран без нарушения жизнеспособности окрашенных тромбоцитов [26]. Разработанный метод включает параллельный анализ структурной целостности и функциональной активности тромбоцитов, при этом морфофункциональное исследование можно проводить как в плазме, так и в любой другой среде, независимо от общей концентрации тромбоцитов [37]. Предложенная методика показала свою высокую эффективность в клинической лабораторной диагностике, производственной трансфузиологии, а также в научно-исследовательской сфере, и представляется эффективной для оценки качества клеток КТК на разных этапах криоконсервирования.

## 1.4 Клиническое применение тромбоцитных компонентов

В XXI веке принята стратегия профилактического и лечебного переливания тромбоцитов [105, 133]. Стратегия трансфузии ТК основана как на тяжести тромбоцитопении, так и на степени проявления геморрагического синдрома (ГС). Для определения тяжести ГС принята шкала ВОЗ, включающая степени от 0 до IV степени [142]. Степень 0 – отсутствие геморрагий. Степень I – петехии/экхимозы, носовое кровотечение менее 1 часа, скрытая кровь в кале и гемоглобинурия (следы), кровоизлияние в сетчатку без изменения зрения, скудное маточное кровотечение. Степень II – мелена, гематурия, кровохарканье, обильное маточное кровотечение, носовое кровотечение более 1 часа, скрытая кровь в кале и гемоглобинурия (умеренная). Степень III – мелена, кровохарканье, гематурия, обильное маточное кровотечение, носовое кровотечение, требующее переливания одной или нескольких доз эритроцитов/день, кровоизлияние в центральную нервную систему, кровотечение из мест венепункции и центрального венозного катетера, которые требуют гемокомпонентной терапии. Степень IV - кровоизлияние в сетчатку с изменением зрения, кровоизлияние в центральную нервную систему с неврологическими признаками, кровотечение в жизненно важные органы (перикард или легкие), массивная кровопотеря с изменением гемодинамики или угрозой наступления смерти. Степень ГС по шкале ВОЗ объективизирует показания для назначения трансфузии ТК.

Лечебные трансфузии ТК проводятся больным с тромбоцитопенией и с клиническим проявлением ГС при следующих патологических состояниях:

1. больным после трансплантации аутологичных стволовых клеток. Степень проявления ГС II и более по шкале ВОЗ, независимо от количества тромбоцитов [70];
2. хирургическим больным с продолжающимся кровотечением при тромбоцитопении менее  $50 \times 10^9/\text{л}$  [77, 134, 136, 140];

3. больным с сочетанной травмой и продолжающимся кровотечением, с тромбоцитопенией менее  $75 \times 10^9/\text{л}$ , которым проводится интенсивная гемотерапия эритроцитсодержащими компонентами (ЭСК) [77, 78];
4. больным после операций с использованием экстракорпоральных методов (независимо от уровня тромбоцитопении исходя из тяжести анемии на фоне кровотечения) [77, 136];
5. больным с острым ДВС-синдромом при выраженном ГС и тромбоцитопении менее  $50 \times 10^9/\text{л}$  [77, 119, 163];
6. больным с нарушениями функции тромбоцитов [77, 136];
7. больным с аутоиммунной тромбоцитопенией при угрозе кровотечения (желудочно-кишечное, внутриглазного и внутримозгового) [76, 77, 130, 136];
8. больным с посттрансфузионной пурпурой для лечения острого кровотечения на фоне введения иммуноглобулинов [77, 136];

Профилактические трансфузии ТК показаны клинически стабильным пациентам с выраженной тромбоцитопенией (концентрация тромбоцитов в крови –  $10 \times 10^9/\text{л}$ ) [77, 134, 136, 173]. При этом у больных не должно быть следующих клинических состояний: лихорадка  $> 38,5$  °С, сепсис, инвазивный аспергиллез, терапия амфотерицином, нарушение плазменного звена гемостаза, нарушение сознания, снижение зрения, состоявшееся кровотечение, значимое снижение тромбоцитов, лейкоцитоз  $> 75 \times 10^9/\text{л}$  [70, 77, 97, 134, 163, 165]. При проведении операций, таких как: люмбальная пункция, эпидуральная анестезия, биопсия печени, эндоскопия с биопсией, постановка центрального венозного катетера – количество тромбоцитов в крови больных должно быть более  $50 \times 10^9/\text{л}$ ; а при оперативном лечении нейрохирургических и офтальмохирургических больных – более  $100 \times 10^9/\text{л}$  [77, 134, 140, 156].

Трансфузии ТК не показаны больным со следующей патологией:

1. больным с тромботической тромбоцитопенической пурпурой и другими микроангиопатиями: гемолитикоуремический синдром и HELLP-синдром – при отсутствии кровотечения [77, 106, 136];

2. больным с гепарин-индуцированной тромбоцитопенией при отсутствии кровотечения [77, 136, 160];

3. больным с аутоиммунной тромбоцитопенией при отсутствии кровотечения [77, 78, 136];

4. больным с хроническим ДВС-синдромом при отсутствии кровотечения [77, 78, 136].

5. больным во время проведения экстракорпоральных методов лечения [77, 136].

В соответствии с рекомендациями AABB следует переливать ТК с профилактической целью больным для снижения риска спонтанных кровотечений при тромбоцитопении:  $10 \times 10^9/\text{л}$  и менее, которая развилась на фоне терапии;  $20 \times 10^9/\text{л}$  и менее, у больных с центральным венозным доступом;  $50 \times 10^9/\text{л}$  и менее, у больных, которым показано выполнение диагностической люмбальной пункции, или нейрохирургических больных; при наличии кровотечения во время кардиохирургического шунтирования [132]. Европейские правила также придерживаются стратегии лечебных трансфузий, ориентированной больше на клинические проявления ГС, а профилактические трансфузии назначают при тромбоцитопении разной степени выраженности [77, 154].

В нормативных документах, принятых в РФ, указано, что профилактические трансфузии ТК проводят по решению лечащего врача и рекомендованы с целью коррекции тромбоцитопении менее  $20 \times 10^9/\text{л}$ , с целью профилактики тромбоцитопенической кровоточивости при тромбоцитопении менее  $50 \times 10^9/\text{л}$  в случае необходимости выполнения инвазивных вмешательств, а также при наличии сепсиса у больных на фоне агранулоцитоза и ДВС-синдрома. Лечебные трансфузии (с гемостатической целью) абсолютно показаны при любой выраженности ГС в сочетании с тромбоцитопенией менее  $50 \times 10^9/\text{л}$ , либо при большем уровне тромбоцитов в случаях наличия тромбоцитопатии, на фоне

острого ДВС-синдрома, массивной кровопотери, любых нейрохирургических и кардиохирургических вмешательствах, особенно операциях с использованием аппарата искусственного кровообращения (АИК) [35, 36]. При этом переливание тромбоцитов не проводят при тромбоцитопении иммунного генеза, за исключением случаев наличия жизненных показаний при развившемся кровотечении [36].

Таким образом, решение о переливании ТК не должно основываться только на концентрации тромбоцитов в крови больного. Абсолютным показанием является выраженная тромбоцитопения, сопровождающаяся клинически значимым кровотечением [107]. Все остальные показания более или менее относительны и зависят от клинического состояния пациента.

КТК производят в центрах крови нескольких стран мира [172]. Польша ежегодно готовит и переливает примерно 11000-13000 доз КТК. В течение 15 лет в Нидерландах криоконсервировали 2554 доз и перелили 1143 доз КТК в 349 пациентам. В Чешской Республике произвели 268 доз КТК в период между 2014 и 2016 годами и перелили 163 дозы 53 пациентам. В Швейцарии получили 40 аутологичных доз КТК и перелили их девяти пациентам через 10 лет, а в Испании приготовили 24 дозы КТК, которые перелили через 3 года. В Австралии заморозили 100 доз КТК для военных и для клинических испытаний. Во Франции, Бразилии, Бельгии и Сингапуре заготовили КТК только для клинических исследований. Ни Канада, ни США не производят КТК, несмотря на то, что у армии США есть активная программа развития криотехнологий крови, которая в настоящее время переходит в фазу 2 клинических испытаний. Сложности в производстве КТК определяются нормативными барьерами. FDA не одобрила КТК для общего клинического применения, и Австралийское управление контроля оборота лекарств (TGA) не разрешило использовать КТК в гражданской медицине. Высокая стоимость является еще одним барьером для многих стран. Австралийцы отмечают, что дополнительные этапы производства КТК и требования к ДМСО клинического класса удорожают стоимость гемокомпонента. Кроме того, сухой лед, необходимый для транспортировки и поддержания единиц

при температуре минус 80°C, также увеличивает расходы. Отсутствие четких европейских директив для производства и применения КТК является препятствием для их использования в клинической практике.

В РФ производство КТК ограничено только исследованиями, которое основано на комбинации ранее разработанных КП. Трансфузии ТК, КК с КП «Тромбокриодмац», эффективно корректируют ГС у гематологических больных. Применение ТК и КТК с профилактической целью предупреждает появление «значимой» кровоточивости, а также безопасно и эффективно у аллоиммунизированных гематологических больных [55, 148]. При сравнении терапевтической эффективности ТК и КТК было показано, что КТК, давая необходимый лечебный эффект, были менее эффективны по сравнению с ТК, заготовленными от одного донора (по результатам теста СПТ через 1ч и 24 ч после трансфузии) [58]. Вместе с тем в Балтиморском центре изучения рака (США), по данным Shiffer С.А. с соавт. [118, 149-151], аутотромбоциты, заготовленные от больных лейкемией в период ремиссий и КК с ДМСО, стали основным гемокомпонентом трансфузионной программы для лечения этих больных. Замораживание 4—6 доз аутологичных ТК осуществляли при температуре минус 120<sup>0</sup>С и хранили в жидком азоте. Эти и др. авторы свидетельствуют, что переливание аутологичных ТК значительно увеличило количество тромбоцитов в кровяном русле больных и оказывает документированный гемостатический эффект, который заключается в укорочении времени кровотечения и прекращении ГС [148].

На международном форуме под эгидой ISBT, посвященном КТК, проведен опрос о преимуществах КТК перед ТК [172]. По результатам опроса основным преимуществом КТК явился длительный срок хранения ТК, обеспечиваемый криоконсервацией. Увеличенный срок хранения обеспечивает большую доступность в сельских и удаленных местах, включая условия боевых действий [117, 126, 127]. Поддержание запасов КТК позволило увеличить контроль над запасами при резком изменении спроса или сокращении числа доноров. КТК, также, транспортабельны на сухом льду и быстро доступны для использования

[61]. Поскольку многие страны ресуспендируют РТ с плазмой группы крови АВ(IV), они также были универсальны для переливания. Windelov NA с соавт. и Tegegn TZ с соавт. отмечали прокоагулянтные свойства КТК, необходимые при лечении больных с сочетанными травмами [81, 120]. Специалисты из Швейцарии, Испании и Польши считают, что возможность выбора КТК, совместимых по НЛА в паре донор-пациент, особенно при рефрактерности у пациента, является важным преимуществом. Для гематологических больных с ожидаемой рефрактерностью переливание КТК, собранных во время ремиссии больного, является предпочтительным гемокомпонентом.

Клиническими критериями эффективности трансфузии (переливания) тромбоцитов являются прекращение спонтанной кровоточивости, отсутствие свежих геморрагий на коже и видимых слизистых [36]. Лабораторным показателем эффективности переливания ТК является СПТ, рассчитанный с учетом антропометрических данных реципиента и дозы ТК через 1 и 24 часа после окончания трансфузии и составляющий более 7500/мкл и 4500/мкл соответственно [142]. Дополнительно для оценки эффективности трансфузии ТК и КТК некоторые авторы используют – тромбоэластографию (ТЭГ), проточную цитометрию и др. [39, 56, 88, 147]. При выполнении ТЭГ для исключения влияния фибриногена Ivo Fluger, с соавт. использовали функциональный фибриноген-реагент (лиофилизированный тканевой фактор с ингибитором тромбоцитов - блокатором рецепторов ГП IIb/IIIa). Он полностью ингибирует тромбоциты, исключая их вклад в прочность сгустка и измеряет только вклад фибриногена в сгусток. Таким образом, максимальная амплитуда формируется – только за счет фибриногена – «функциональный фибриноген» [88]. Проточная цитометрия позволяет тестировать поверхностные маркеры тромбоцитов, в частности комплекс ГП IIb. Лучший *in vivo* прирост количества тромбоцитов через 1-2 часа после окончания трансфузии и продолжительность жизни тромбоцитов связаны с нормальным содержанием ГП IIb и сниженным связыванием аннексина V [147]. Возможные действия аллогенных тромбоцитов в гемостазе включают прямое формирование гемостатического сгустка, увеличение адгезии тромбоцитов

реципиента, поддержание развития протромбиназного комплекса и регуляцию формирования тромба.

### **1.5 Иммунологическая совместимость донорских тромбоцитов с реципиентами**

Правила переливания ТК, принятые в РФ, США и Европе, не предусматривают индивидуального подбора ТК перед трансфузией реципиенту, несмотря на то, что тромбоциты являются носителями трех аллогенных систем: ABO, HLA и HPA [17]. В соответствии с приказами МЗ РФ № 363 и 183н при переливании ТК пара "донор-реципиент" должна быть совместима по антигенам систем ABO и Резус-фактор, другие антигены эритроцитов C, c, E, e, C<sup>w</sup>, K и k не учитывают и пробы на индивидуальную совместимость не проводят [35, 36]. Однако следует помнить, что в ТК содержится остаточное количество эритроцитов, которые могут привести к аллоиммунизации реципиента, выработке антиэритроцитарных антител и низкой клинической эффективности ТК [17]. В связи с этим для обеспечения высокой клинической эффективности требуется тщательный иммунологический подбор ТК [4, 148].

Длительная и интенсивная трансфузионная терапия приводит к появлению анти-HLA и анти-HPA антител не только у пациентов, страдающих онкогематологическими заболеваниями (лейкоз, миелодисплазия и др.), но и у кардиохирургических больных [3, 15, 152]. Последствием аллоиммунизации является рефрактерность, выражающаяся в отсутствии как прироста тромбоцитов в крови, так и гемостатического эффекта, которая требует увеличения количества трансфузий по сравнению с обычной практикой на 40 - 60% [35, 36]. Образование АТА является причиной посттрансфузионных реакций и требует подбора доноров тромбоцитов по системам HLA и HPA [36]. Независимо от специфичности, их действие приводит либо к лизису тромбоцитов, либо к фагоцитозу тромбоцитов макрофагами [17]. Анализ 788 цитат и 30 докладов, посвященных HLA-

типированию и выявлению анти-HLA, проведенный Ravenski K с соавторами, показал, что более высокий СПТ и высокий процент восстановления тромбоцитов через 1 час наблюдали после трансфузии HLA-совместимых ТК больным с рефрактерностью; эффект через 24 часа не был доказан [99].

Выявление аллоантител основано на принципе взаимодействия антииммуноглобулина с находящимися на поверхности тромбоцита антителами. К таким методам относят твердофазный метод и лимфоцитотоксический тест (ЛЦТ), направленный на выявление анти-HLA антител, иммунохимические методы ИФА, метод иммобилизации антигенов на моноклональных антителах, [17]. В РФ наибольшую популярность получили ИФА и ЛЦТ, с помощью которых специалистам Гематологического научного центра (Москва) удавалось подбирать ТК, избегать развития посттрансфузионных осложнений у пациентов и сокращать в несколько раз количество трансфузий ТК [14, 15]. Снижение количества трансфузий позволило получить мощный экономический эффект, выраженный в экономии более 1050 Евро в месяц на одного аллоиммунизированного пациента в месяц [14, 152].

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Объем и дизайн исследования качества ТК и КТК, а также их клинической эффективности**

Диссертационная работа состояла из трех этапов исследования:

- 1-й этап – морфофункциональный анализ тромбоцитов, используемых в клинической практике;
- 2-й этап – разработка оригинальной методики КК тромбоцитов;
- 3-й этап – оценка клинической эффективности КТК.

Объекты исследования включали: кровь доноров, кровь больных с изменениями в системе клеточного гемостаза, ТК и КТК.

На 1-м этапе исследовали тромбоциты в крови и в ТК, полученных методом афереза. Исследованы тромбоциты крови 1000 доноров; 800 лечебных доз ТК. Кровь доноров набирали в пробирки с цитратом натрия в соотношении 9:1. ТК получали методом афереза на сепараторе крови Trima Accel в отделении клинической, производственной трансфузиологии и гравитационной хирургии крови ГБУЗ «НИИ СП им.Н.В.Склифосовского ДЗМ» (зав. отделением, к.м.н. Костин А.И.). Дизайн и объем исследования представлен на рисунке 1.

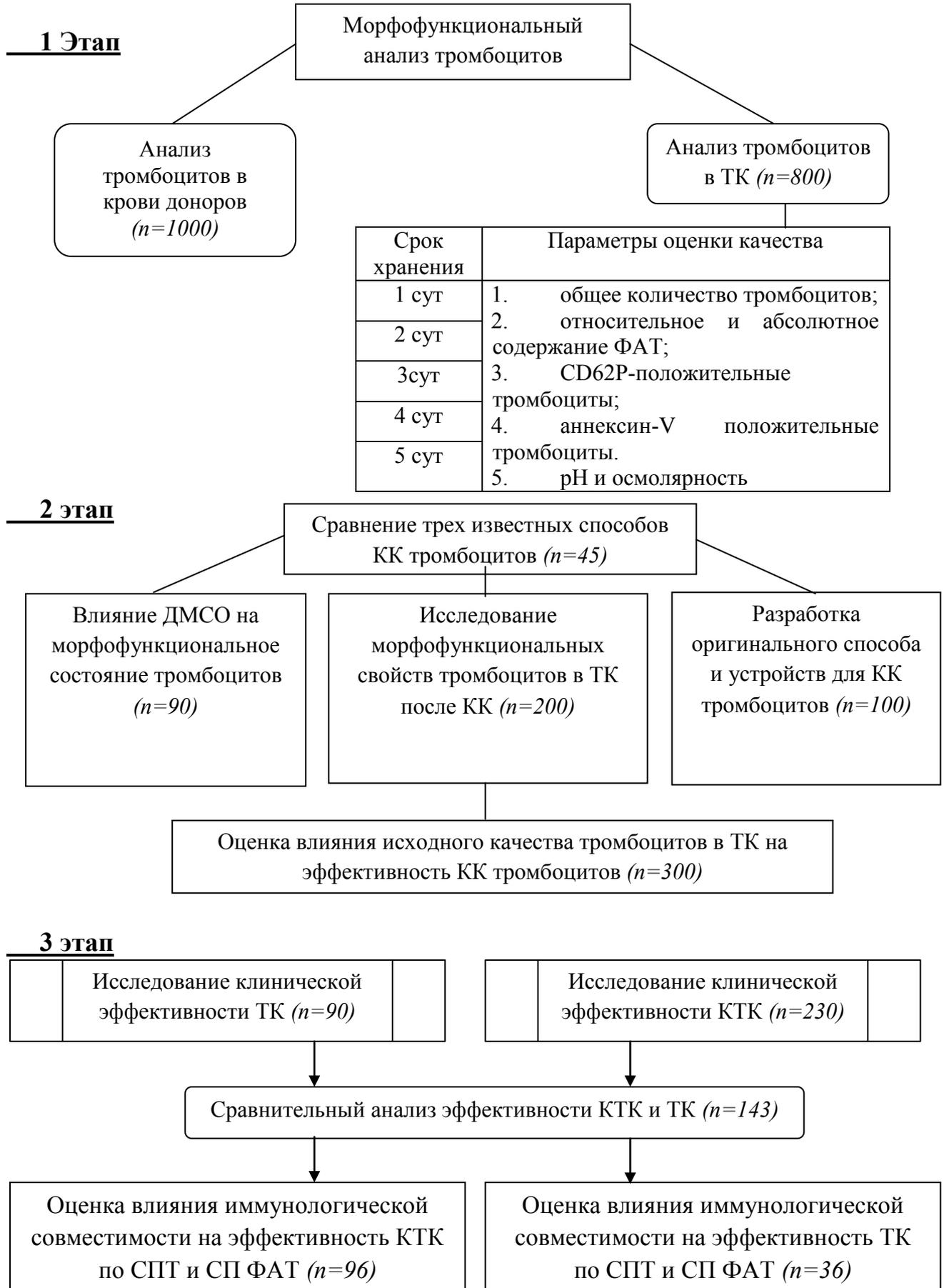


Рисунок 1 – Дизайн и объем исследования

На 2-м этапе анализировали качество тромбоцитов в 735 лечебных дозах ТК на разных стадиях КК. На первом этапе оценили эффективность известных способов КК тромбоцитов (45 исследований), влияние разных доз ДМСО на качество тромбоцитов (90 исследований). Затем разработали оригинальный способ и устройства для КК тромбоцитов (100 исследований), исследовали морфофункциональные свойства тромбоцитов в ТК после КК (200 исследований), оценили влияние исходного качества тромбоцитов в ТК на эффективность КК тромбоцитов (300 исследований).

На 3-м этапе исследовали клиническую эффективность 90 доз ТК, полученных методом афереза, и 230 доз КТК, заготовленных по разработанной методике. Кроме того, провели сравнительный анализ качества тромбоцитов в крови 143 пациентов, которым переливали КТК (основная группы) и ТК (контрольная группы) для коррекции клеточного гемостаза при различных патологических состояниях: 13 пациентов с множественной и сочетанной травмой; 60 кардиохирургических больных после операции протезирования клапанов сердца и восходящего отдела аорты с использованием АИК; 10 больных после трансплантации легких с экстракорпоральной мембранной оксигенацией (ЭКМО); 10 больных с ХПН после трансплантации печени на 1-7 сутки после трансплантации; 50 больных с нейрохирургической патологией. Показания к трансфузии включали тромбоцитопению потребления, а также клинически выраженный ГС или массивная кровопотеря от 1000 до 5000 мл (II-IV степени по шкале ВОЗ). Характеристика больных представлена в таблице 1 и 2.

У всех пациентов определяли количество и качество тромбоцитов в крови до трансфузии, через 1 час и через 24 часа после окончания трансфузий, рассчитывали СПТ через 1 час и через 24 часа после окончания трансфузий. Кроме того, у 132 пациентов проводили тест на иммунологическую совместимость с ТК и КТК.

Таблица 1 – Характеристика больных, которым проводили трансфузии ТК

Диагноз	Возраст, лет	Концентрация тромбоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	ФАТ, %
Сочетанная травма ( $n=7$ )	27-56	10-64	1-8
Состояние после протезирования клапанов сердца с АИК ( $n=25$ )	67-75	43-59	13
Состояние после протезирования аорты с АИК ( $n=10$ )	70-79	97-110	20
Состояние после трансплантации легких ( $n=6$ )	46-75	26-40	0-10
Состояние после трансплантации печени ( $n=5$ )	36-66	39-159	0-13
Нейрохирургические патологии ( $n=27$ )	55-58	52-116	2-5

Таблица 2 – Характеристика больных, которым проводили трансфузии КТК

Диагноз	Возраст, лет	Концентрация тромбоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	ФАТ, %
Сочетанная травма ( $n=6$ )	18-52	41-96	1-15
Состояние после протезирования клапанов сердца с АИК ( $n=20$ )	57-70	27-93	2-30
Состояние после протезирования аорты с АИК ( $n=5$ )	31-80	42-129	0-15
Состояние после трансплантации легких ( $n=4$ )	46-50	30-72	3-5
Состояние после трансплантации печени ( $n=5$ )	17-87	20-132	0-17
Нейрохирургические патологии ( $n=23$ )	34-64	49-97	1-6

## 2.2 Заготовка и хранение тромбоцитных концентратов

ТК получали на аппарате Trima Accel методом афереза [108]. Перед тромбоцитаферезом доноров обследовали в соответствии с Приказом Минздрава РФ N364 от 14 сентября 2001 г. «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов». Заготавливали ТК у доноров мужчин и женщин в возрасте от 18 до 60 лет. Объем ТК, полученных методом афереза, составил 200 мл, количество тромбоцитов не менее  $200 \times 10^9$  в дозе. ТК хранили при температуре от 20 до 24°C и непрерывном помешивании в течение 5 суток.

## 2.3 Морфофункциональный анализ тромбоцитов

Качество тромбоцитов определяли методом оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека [31]. Этот метод основан на витальном окрашивании тромбоцитов флуорохромным красителем: трипафлавин и акридиновый оранжевый – с последующим их анализом во флуоресцентном микроскопе. Данный метод позволяет одновременно оценить структурную целостность и функциональную активность тромбоцитов независимо от их концентрации в пробе, в том числе – в бесплазменной среде. Для этого готовили витальный краситель для тромбоцитов путем разведения 10 мг трипафлавина и 20 мг акридинового оранжевого при комнатной температуре в 100 мл фосфатного буфера (рН - 7,2-7,4), окрашивали анализируемые пробы из расчета 200 мкл готового красителя на 1 мл пробы в течение 2-5 мин при комнатной температуре, после чего 5 мкл пробы с окрашенными тромбоцитами переносили на предметное стекло и накрывали покровным стеклом. Витально окрашенный препарат анализировали на флуоресцентном микроскопе “Nikon Eclipse 80i” с флуоресцентной насадкой “Nikon D-eclipse C1si” (фирма “Nikon”, США).

Препараты тромбоцитов микроскопировали под объективом  $\times 100$  с числовой апертурой 1.25. Для получения флуоресцентного изображения использовали светофильтр ( $\lambda$  возбуждения 450-490нм,  $\lambda$  эмиссии – от 520нм). Полученные изображения фотографировали с помощью цифровой фотокамеры “Nikon” (“Nikon”, США) при экспозиции 0.25-0.5 сек. Для морфометрического исследования тромбоцитов использовали программу Adobe Photoshop 7.

В ходе анализа определяли следующие параметры тромбоцитов:

1) Общая концентрация тромбоцитов,  $\times 10^9/\text{л}$ .

2) Содержание ФАТ, относительное (%) и абсолютное ( $\times 10^9/\text{л}$ ). Параметр ФАТ отражает структурную и функциональную полноценность тромбоцитов в пробе. К ним относятся тромбоциты, содержащие гранулы, с нормальной структурой цитоплазмы и способные к адгезии на стекле. Содержание гранул на 1 тромбоцит должно составлять от 5 до 20, если размер отдельно взятых гранул составляет не менее 300 нм, или 3-4, если размер отдельно взятых гранул составляет не менее 500 нм [26, 46]. Целостность цитоплазмы определяли по уровню ее яркости при витальном окрашивании. В структурно полноценных тромбоцитах яркость цитоплазмы составляла не менее 24-25 фут-кандел [46]. При адгезии тромбоциты претерпевали морфологические изменения: увеличение диаметра тромбоцита; образование ламеллоподий; смещение тромбоцитарных гранул к периферии цитоплазмы и выход за ее пределы.

Например, при исследовании 150 тромбоцитов в анализируемом образце 85 клеток содержали гранулы, имели нормальную яркость цитоплазмы и адгезировали на стекле. Относительное содержание ФАТ составляет  $85:150 \times 100 = 56,7\%$ .

Концентрацию ФАТ ( $K_{\text{ФАТ}}$ ),  $\times 10^9/\text{л}$ , рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{ФАТ}} = \text{ФАТ} (\%) \times K / 100 \%$$

3) Сохранность количества тромбоцитов в КТК после размораживания ( $S_{\text{К}}$ , %) рассчитали по формуле:  $S_{\text{К}} = K_1/K_0$ , где

$K_0$  – количество тромбоцитов в ТК до КК,  $\times 10^9/\text{мл}$

$K_1$  – количество тромбоцитов в ТК после КК и размораживания,  $\times 10^9/\text{мл}$ ;

4) Сохранность ФАТ ( $C_{\text{ФАТ}}$ , %) после КК и размораживания ТК.  $C_{\text{ФАТ}}$  рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{ФАТ}} = K_{\text{ФАТ крио}} / K_{\text{ФАТ исх}} \times 100\%, \text{ где}$$

$K_{\text{ФАТ исх}}$  – количество тромбоцитов с гранулами и способных к адгезии в ТК до КК,  $\times 10^9/\text{мл}$ ;

$K_{\text{ФАТ крио}}$  – количество тромбоцитов с гранулами и способных к адгезии в ТК после КК и размораживания,  $\times 10^9/\text{мл}$

## **2.4 Определение pH и осмолярности в тромбоцитных концентратах и криоконсервированных тромбоцитах**

Измерение pH в ТК и РТ проводили неинвазивным методом на приборе BCSI pH1000 (Blood Cell Storage Inc., США). Для измерений на приборе BCSI pH1000 переводили ТК и КТК в специальные аэрируемые контейнеры, предназначенные для хранения тромбоцитов, содержащие оптический порт. Измеряли pH в ТК каждые сутки. После измерения pH хранили ТК и КТК (до трансфузии) в этих контейнерах при температуре от 20 до 24<sup>0</sup>С и непрерывном помешивании в течение 5 суток.

Осмолярность ТК и КТК определяли на осмометре Osmomat 030. Для этого 50 мкл образца ТК и КТК переносили в измерительную кювету и фиксировали в термисторе прибора. Перед началом измерения прибор калибровали с помощью калибровочных растворов с известной осмолярностью 850 и 2000 мОсмоль/л.

## **2.5 Цитометрия тромбоцитов**

Исследование тромбоцитов проводили на цитометре Ассигі С6. Образцы ТК разводили в 10 раз буфером А (20 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.4 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 мМ глюкозы, 0,5% бычий сывороточный альбумин, pH 7.4). К 10 мл разведенного ТК добавляли по 10 мкл раствора антитела в буфере А

с  $\text{CaCl}_2$  (5мМ). Инкубировали тромбоциты с антителами 5 минут при комнатной температуре. Каждую пробу разводили в 10 раз буфером А с  $\text{CaCl}_2$  (2,5мМ), после чего проводили анализ. Для выявления необратимо активированных тромбоцитов использовали антитела к CD62p (P-селектин), для выявления тромбоцитов в состоянии апоптоза использовали маркер фосфатидилсерина Annexin V.

## 2.6 Методы криоконсервирования тромбоцитов

В работе оценивали эффективность 3-х ранее известных способов КК тромбоцитов с помощью ДМСО.

**Первый способ** КК [84]. Раствор ДМСО вводится в готовый ТК до конечной концентрации 6% с последующей заморозкой и хранением при температуре минус  $80^\circ\text{C}$ . После размораживания тромбоциты отмывают от ДМСО и разводят плазмой.

**Второй способ** КК [170]. Раствор ДМСО вводится в готовый ТК до конечной концентрации 6%, затем ТК в присутствии ДМСО центрифугируют при 1250g в течение 10 минут с целью удаления супернатанта, содержащего избыток ДМСО. Весь супернатантный раствор удаляют. Это снижает остаточное количество ДМСО в замороженном ТК как минимум на 95%. Оставшийся осадок объемом 10-15 мл ресуспендируют покачиванием в течение 3-5 минут, контейнер с суспензией тромбоцитов помещают в защитный полимерный пакет, затем в картонную коробку и замораживают на дне механического морозильника при температуре минус  $80^\circ\text{C}$ . Размораживание тромбоцитов проводится в водяной бане (Thermogenesis), при температуре  $36^\circ\text{C}$  в течение 5 минут. Размороженную суспензию тромбоцитов разводят 10-20 мл 0,9% раствора NaCl.

**Третий способ** КК [25]. Раствор ДМСО вводится в готовый ТК до конечной концентрации 10% с последующей заморозкой и хранением при температуре минус  $196^\circ\text{C}$ . После размораживания тромбоциты ресуспендируют в 2-3 объемах

однотипной плазмы. Качество РТ определяют по ретрактивной активности тромбоцитов тестом Kissmeyer-Nielsen

В настоящей работе предлагается оригинальная методика КК тромбоцитов. Схема представлена на Рисунке 2. Более подробное раскрытие метода приводится в главе 4 диссертации.

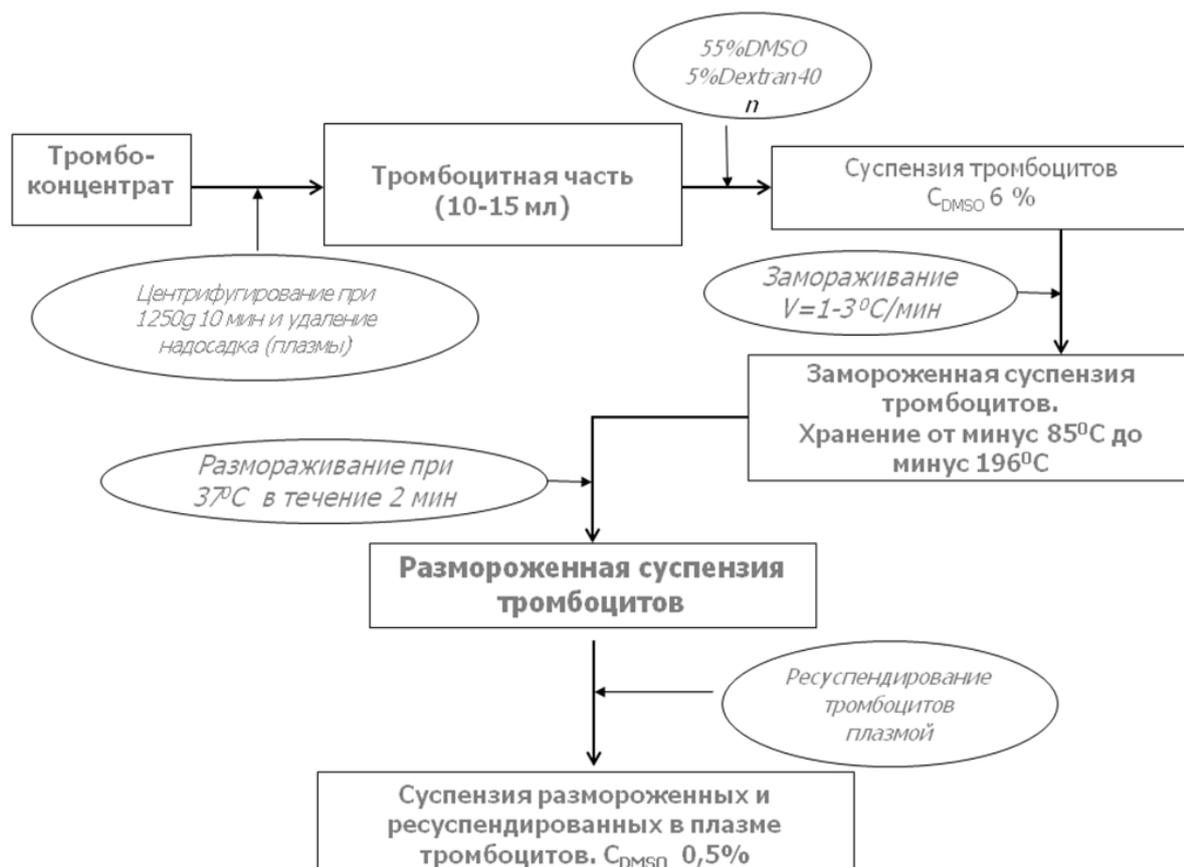


Рисунок 2 – Схема способа КК тромбоцитов, разработанного в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В.Склифосовского ДЗМ»

## **2.7 Определение концентрации диметилсульфоксида в криоконсервированных тромбоцитах**

Количество ДМСО в РТ определяли на газовом хроматографе Shimadzu GC-17A (Япония) с пламенно-ионизационным детектором и автосамплером [51]. Для хроматографирования применяли капиллярную колонку HP-FFAP фирмы Agilent Technologies (США) с полярной фазой (100% полиэтиленгликоль), длина – 25 м, диаметр – 0,32 мм, толщина привитой фазы 0,5 мкм, орбитальный шейкер Elmi S-3L, центрифуга Eppendorf 5804. Использовали следующие реактивы и органические растворители: метанол (о.с.ч.), хроматографические стандарты диметилсульфоксид и диметилформамид. В качестве газа-носителя использовался гелий. Перед хроматографированием проводили экстракцию ДМСО. Для этого 100 мкл тромбоцитарной массы помещают в пробирку объемом 2 мл, добавляют 900 мкл метанола и 50 мкл метанольного раствора диметилформамида в концентрации 22 мг/мл. Полученную смесь перемешивали на орбитальном шейкере Elmi S-3L в течение 30 минут. Затем центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Надосадочный слой декантировали и перенесли в другую пробирку. Затем 1 мкл полученного раствора инжесктировали в хроматограф.

## **2.8 Определение иммунологической совместимости тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов с реципиентами**

Выявление антитромбоцитарных антител (АТА) и иммунологической совместимости ТК и КТК с реципиентами проводили на аппарате Immucor NEO. Реагент Capture-P<sup>®</sup> Ready-Screen – для выявления АТА к антигенам систем HLA и HPA представляет стрипы 2x8 с лунками, на стенках которых иммобилизованы высушенные тромбоциты. Метод позволяет выявлять АТА как к антигенам систем HPA и HLA – к антигенам локусов HLA-A и HLA-B. Вначале на поверхности лунок формируют подложку из тромбоцитов донора, которые

связывают антитела реципиента. После добавления индикаторных эритроцитов с фиксированными антителами анти-IgG происходит связывание с иммуноглобулинами, присоединившихся к фиксированным на поверхности лунок тромбоцитам. При положительной реакции индикаторные эритроциты не могут мигрировать на дно лунок и распределяются равномерно по поверхности лунки. При отрицательной реакции – осаждаются на дно лунки образуя «пуговицу» (Рисунок 3)

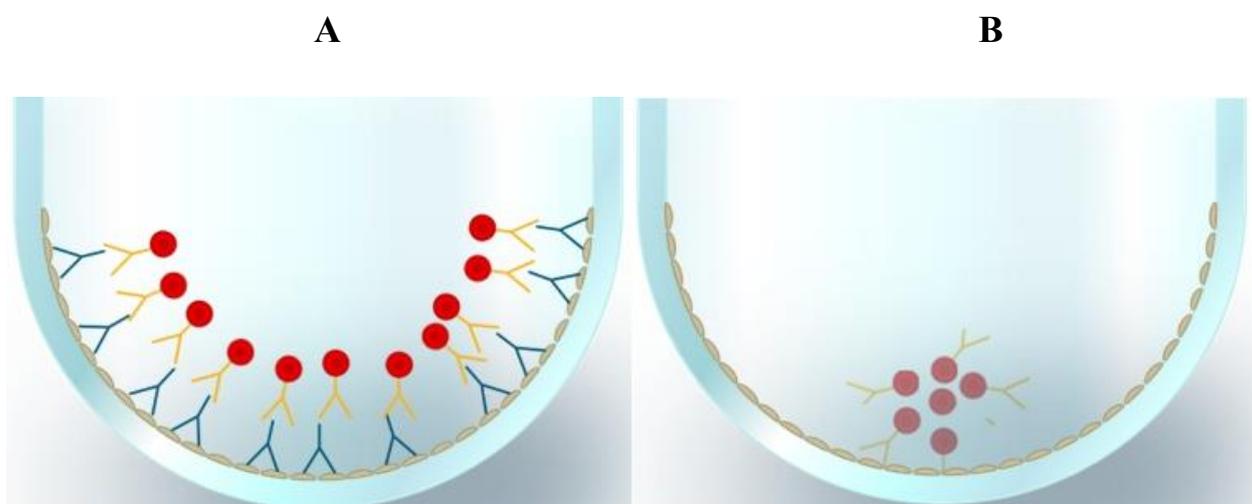


Рисунок 3 – Результаты реакции Capture-P. А. *При положительной реакции* индикаторные эритроциты выстилают дно лунки. В. *При отрицательной реакции* индикаторные эритроциты мигрируют на дно лунки, образуя «пуговицу»

Процедуру определения АТА и совместимости проводили в соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов, с учетом концентрации используемого ТК и КТК, которая составляла от  $0,8$  до  $2,0 \times 10^9$ /мл. Анализ оценивали по наличию адгезии индикаторных эритроцитов в лунках планшеты. Положительная реакция – наличие адгезии эритроцитов по всей поверхности. Отрицательная реакция – адгезия отсутствует и на дне лунки формируется осадок «пуговица». При сравнении результатов с отрицательным и положительным контролем тест считали отрицательным, если в обеих лунках и в лунке аутоконтроля донора получен отрицательный результат. Тест считали

положительным, если в обеих лунках получен положительный результат при отрицательном результате аутоконтроля донора.

## 2.9 Оценка эффективности трансфузии тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов

Эффективность трансфузий ТК и КТК оценивали клинически и по СПТ (п. 6. раздел II. Приказ № 183н МЗ РФ. «После каждой трансфузии (переливания) донорской крови и (или) ее компонентов проводится оценка ее эффективности. Критериями эффективности трансфузии (переливания) донорской крови и (или) ее компонентов являются клинические данные и результаты лабораторных исследований»). Расчет СПТ проводили по формуле:

$$\text{СПТ} = \frac{\text{ПТр} * \text{ПТ}}{\text{ДТр}}$$

,где

СПТ – скорректированный прирост тромбоцитов,  $\times 10^9$

ПТр –прирост тромбоцитов,  $\times 10^9$

ПТ – поверхность тела,  $\text{м}^2$

ДТр – доза перелитых тромбоцитов,  $\times 10^{11}$

Трансфузию ТК и КТК считали эффективной при значении СПТ через 1 и 24 часа более  $7,5 \times 10^9/\text{л}$  и  $4,5 \times 10^9/\text{л}$  соответственно [77]. Кроме того, у всех пациентов оценивали качество тромбоцитов и ФАТ в крови до трансфузии, через 1 час и через 24 часа после трансфузии.

## 2.10 Статистический анализ

Полученные статистические данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики.

Проводили точечные (среднее) и интервальные (доверительный интервал) оценки параметров сравниваемых выборок. На основе t-статистики (t-критерий Стьюдента) проверялась гипотеза о совпадении точечных оценок.

1. Рассчитывали следующие статистические показатели:

- среднее (оценка математического ожидания,  $\bar{x}$ ):
- дисперсия (оценка дисперсии  $\sigma^2=D$ ):
- стандартное отклонение (оценка стандартного отклонения,  $\sigma$ ):
- доверительный интервал:
- t-статистика:

Где  $n$  – объем выборки;  $x_i$  - значение параметра;  $t_n^\alpha$  - коэффициент Стьюдента ( $\alpha$  - уровень значимости (0,05);  $\nu$  - число степеней свободы).

2. В случае, если  $t_{\text{расчетный}}$  был больше  $t_n^\alpha$ , то оцениваемые точечные значения значимо отличались. Если  $t_{\text{расчетный}}$  был меньше  $t_n^\alpha$ , отличия считали незначимыми.

3. Рассчитывали медиану и оценивали различие СПТ у больных разных групп после трансфузии ТК и КТК по U-критерию Манна-Уитни.

При расчете стоимости гемотрансфузионной терапии учитывали себестоимость гемокомпонентов, а также расходных материалов, использованных для выполнения исследований по выявлению антител и совместимости с ТК и КТК. Формула расчета стоимости трансфузионной терапии после совместимой трансфузии включала также и стоимость исследования на совместимость. В расчетную стоимость не включали стоимость самого ТК или КТК, индивидуально подбираемого для реципиента.

### Глава 3. Морфофункциональный анализ тромбоцитов в крови доноров и в тромбоцитных концентратах, используемых в клинической практике

#### 3.1 Концентрация и активность тромбоцитов в крови доноров и в тромбоцитных концентратах

Для получения ТК, используемых в клинической практике, общепринятым является отбор доноров, исходя из количества тромбоцитов в их крови [34]. Анализ частоты встречаемости количества тромбоцитов в крови у 1000 обследованных доноров показал «нормальное распределение» (Рисунок 4).

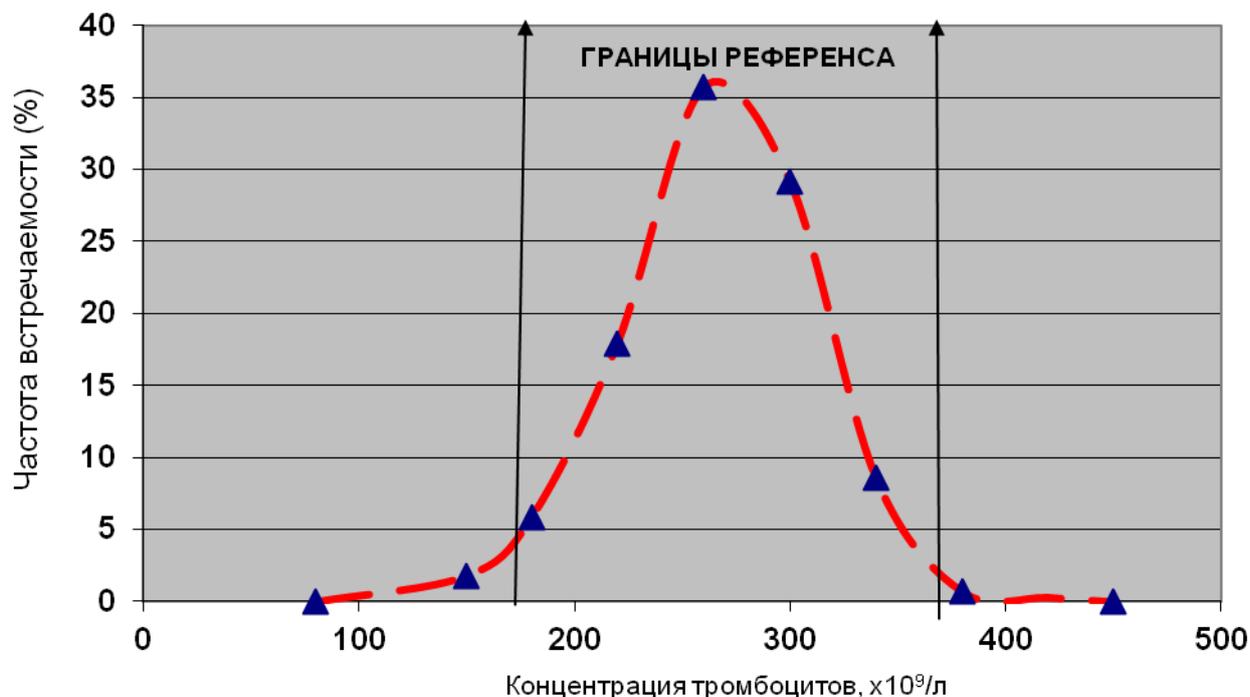


Рисунок 4 – Распределение доноров по общей концентрации тромбоцитов в крови

При этом содержание тромбоцитов варьировало от 160 до  $420 \times 10^9/\text{л}$ , а у 92% доноров количество тромбоцитов в крови соответствовало референсным значениям ( $180\text{-}360 \times 10^9/\text{л}$ ), составляя в среднем  $258 \pm 21 \times 10^9/\text{л}$ .

Анализ количества тромбоцитов в ТК, полученных методом афереза, показал, что большинство ТК (77%) имели концентрацию тромбоцитов от 900 до

$1600 \times 10^9/\text{л}$ , у 6% ТК концентрация тромбоцитов была менее  $900 \times 10^9/\text{л}$ , а в 15% случаев – более  $1600-2000 \times 10^9/\text{л}$ . Средняя концентрация тромбоцитов в ТК составила  $1225 \pm 195 \times 10^9/\text{л}$ , что в 4,7 раза выше аналогичного параметра в крови доноров.

Однако концентрация тромбоцитов в циркулирующей крови и содержание в ТК не может служить оценкой структурной целостности и ФАТ. Отметим, что качество исходных тромбоцитов имеет принципиальное значение как при трансфузиях ТК, так и при их КК, и должно включать оценку содержания биологически полноценных тромбоцитов, потенциально способных к активации. Для определения качества тромбоцитов нами предложен параметр ФАТ. Этот параметр является интегральной характеристикой качества тромбоцитов и отображает содержание структурно и функционально полноценных клеток во всей популяции тромбоцитов.

Анализ показал, что распределение доноров по относительному содержанию ФАТ в их крови было неоднородным (Рисунок 5). У 21% доноров относительное содержание ФАТ в популяции тромбоцитов составило 30-40 %, у 74% - этот параметр варьировал от 41 до 70%, у 5 % доноров содержание ФАТ было выше 70%, однако не превышало 75%. Особо отметим, что неоднородность содержания ФАТ у доноров выявлялась независимо от общего количества тромбоцитов в циркулирующей крови. Наиболее часто относительное содержание ФАТ было на уровне 51-60%. Высокое относительное содержание ФАТ (70%-75%) встречалось у доноров с концентрацией тромбоцитов менее  $200 \times 10^9/\text{л}$ , в 4 раза чаще, чем у доноров с концентрацией тромбоцитов  $300-400 \times 10^9/\text{л}$ . Отметим, что низкие значения ФАТ (35-40%) чаще встречались у доноров с концентрацией тромбоцитов  $200-300 \times 10^9/\text{л}$ . В целом, распределение доноров по относительному уровню ФАТ имеет сходный вид на фоне разной общей концентрации тромбоцитов (Рисунок 5).

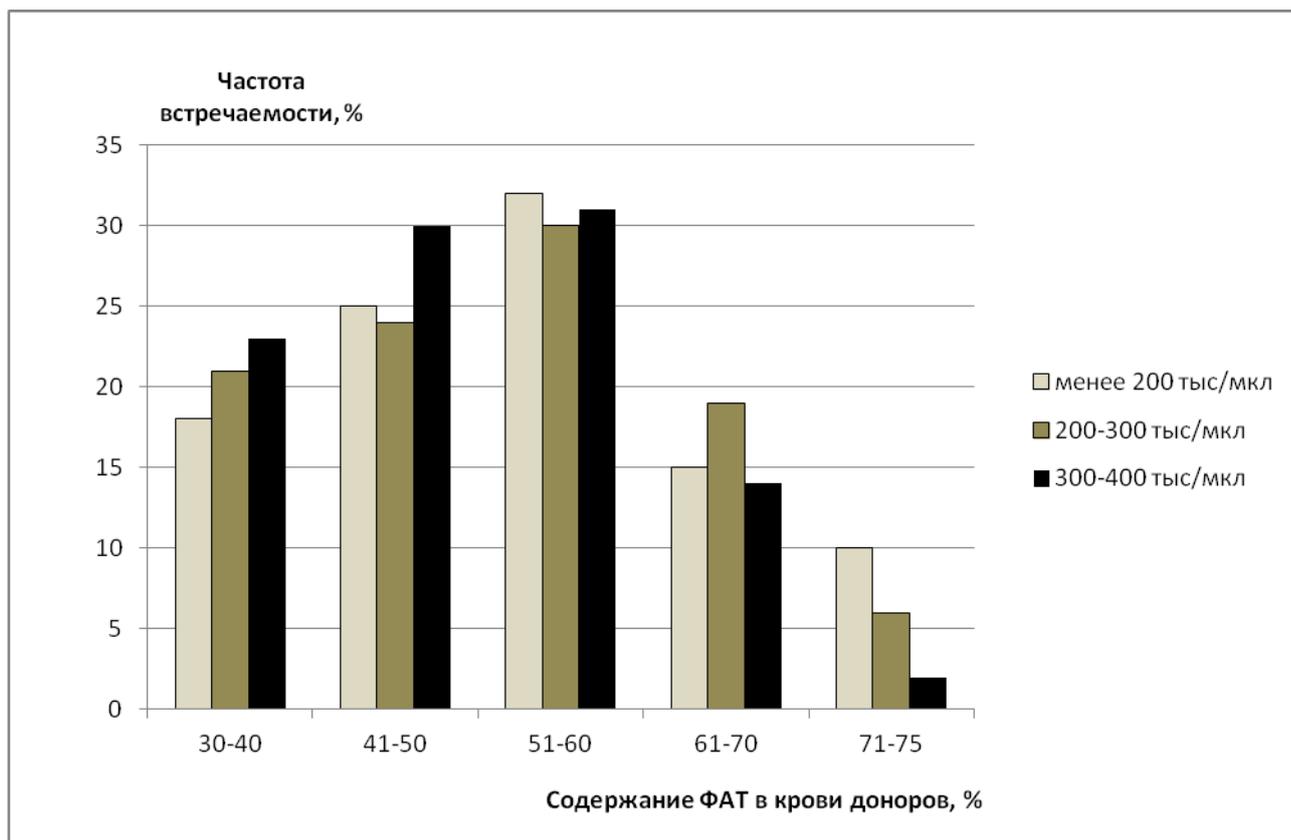


Рисунок 5 – Распределение доноров по относительному содержанию ФАТ в крови

В среднем, в популяции доноров крови относительное содержание ФАТ составляло  $53,5 \pm 4,5\%$ . Абсолютное содержание ФАТ в крови доноров также было неоднородным и варьировало от 60 до  $240 \times 10^9/\text{л}$ , составляя в среднем  $134 \pm 20 \times 10^9/\text{л}$ . Таким образом, в крови доноров содержание ФАТ было в среднем в 2 раза ниже, чем общая концентрация тромбоцитов.

Отметим, что относительное содержание ФАТ в ТК было сопоставимым с тем, что наблюдали в крови доноров и составляло  $52,0 \pm 6,2\%$  (Рисунок 6).

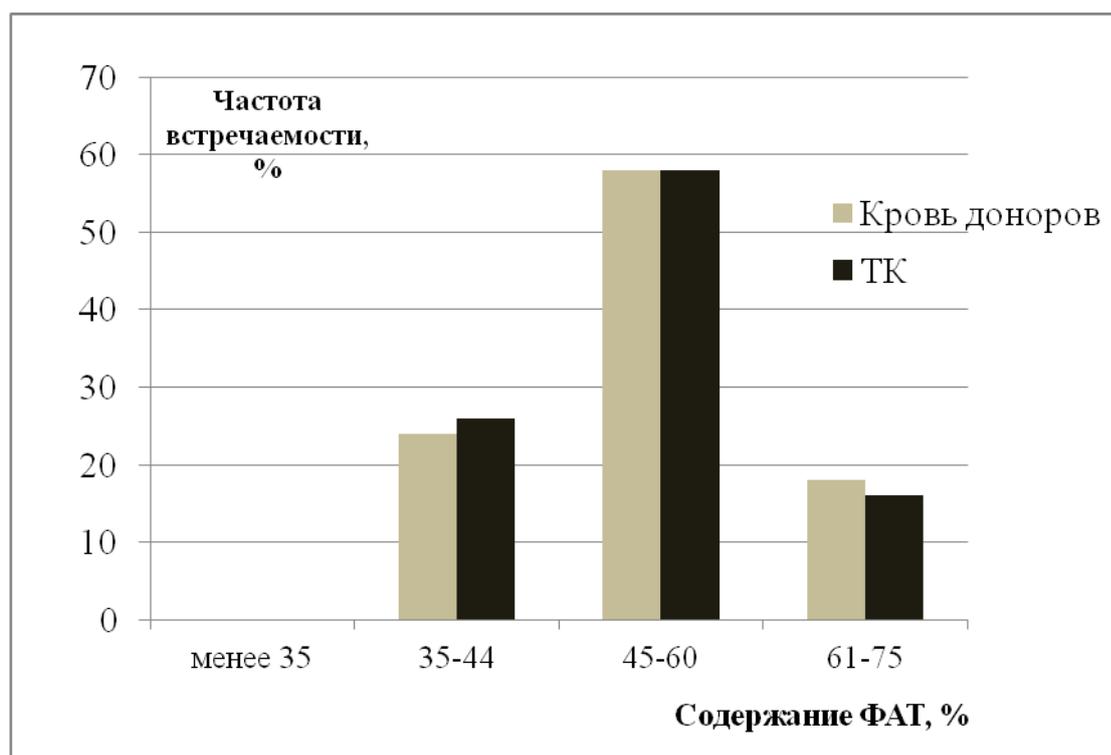


Рисунок 6 – Распределение доноров и ТК по относительному содержанию ФАТ

При анализе распределения доноров и ТК было выделено 3 группы: ТК с уровнем ФАТ от 35 до 44%, ТК с уровнем ФАТ от 45 до 60% (основная группа) и ТК с уровнем ФАТ от 61-до 75% (Рисунок 6). Частота встречаемости доноров и ТК с ФАТ 45-60% была сходной и составила 58%. Таким образом, процедура тромбоцитафереза значимо не влияло на качество тромбоцитов. В заготовленных дозах ТК концентрация ФАТ варьировала от 400 до 800  $\times 10^9/\text{л}$ , составляя в среднем  $637,2 \pm 54,5 \times 10^9/\text{л}$ , что превышает аналогичный параметр в крови доноров в 4,8 раза.

### 3.2 Оценка качества тромбоцитов доноров с учетом гендерных различий

Для анализа были предварительно отобраны доноры, постоянно осуществляющие донацию тромбоцитов (кадровые доноры), из них 100 мужчин (средний возраст  $33 \pm 11$  лет) и 100 женщин (средний возраст  $38 \pm 12$  лет). У каждого донора проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов в

цельной крови и в ТК. Не выявлено существенных отличий по общей концентрации тромбоцитов в крови и ТК между донорами-мужчинами и донорами-женщинами. У мужчин среднее значение общей концентрации тромбоцитов в крови и ФАТ не зависело от возраста донора. У женщин в возрастной группе от 20 до 39 и от 50 до 60 лет средние значения ФАТ были достоверно выше, чем в группе 40-49 лет, однако эти различия не превышали 15%. Было установлено, что общая концентрация ФАТ у доноров-женщин была достоверно выше как в крови, так и в ТК по сравнению с донорами-мужчинами (Таблица 3). ТК, полученные методом афереза, от доноров-женщин в среднем содержат в 1,2 раза больше ФАТ по сравнению с ТК доноров-мужчин ( $p \leq 0,05$ ). При этом в обеих группах отмечена высокая неоднородность по уровню ФАТ.

Таблица 3 – Морфофункциональные параметры тромбоцитов в крови кадровых доноров и в полученных ТК

Анализируемые параметры	Мужчины ( $n=100$ ) М $\pm$ $\sigma$	Женщины ( $n=100$ ) М $\pm$ $\sigma$
Кровь доноров		
Общая концентрация тромбоцитов $\times 10^9/\text{л}$	260 $\pm$ 44	251 $\pm$ 50
Доля ФАТ, (%)	50 $\pm$ 9	59 $\pm$ 11*
Концентрация ФАТ, $\times 10^9/\text{л}$	130 $\pm$ 14	148 $\pm$ 15*
ТК доноров		
Количество тромбоцитов, $\times 10^{11}/\text{дозе}$	2,6 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,7
Доля ФАТ, %	48 $\pm$ 10	57 $\pm$ 13*
Концентрация ФАТ, $\times 10^{11}/\text{дозе}$	1,25 $\pm$ 0,13	1,48 $\pm$ 0,12*
* $P \leq 0,05$		

### 3.3 Анализ качества тромбоцитов в процессе хранения тромбоцитных концентратов

По требованиям Технического Регламента продолжительность хранения ТК составляет 5 суток, включает мониторинг общей концентрации тромбоцитов и рН, но при этом не проводится анализа структурной и функциональной полноценности тромбоцитов. В этой связи целенаправленно анализировали содержание ФАТ в ТК, которые хранили при температуре от 20 до 24 °С и непрерывном помешивании в течение 1-5 суток. Всего обследовали 900 доз ТК. Общая концентрация тромбоцитов и рН в ТК в процессе 5 суток хранения значительно не изменились. Количество тромбоцитов в ТК варьировало от 250 до  $270 \times 10^9$ /дозе, а рН – в пределах от 7,1 до 7,3, что соответствовало норме (таблица 2). Количество ФАТ в течение 2 суток хранения существенно не изменялся, через 3-4 суток хранения наблюдалось заметное снижение абсолютного и относительного содержания ФАТ в 2,6-4,0 раза по сравнению с исходным на фоне сохранения общего количества тромбоцитов в ТК. Через 5 суток хранения ТК уже практически не содержали ФАТ, а значение ФАТ не превышало 1-2% (Таблица 4). Параллельный анализ ФАТ и маркеров тромбоцитарной активации и апоптоза показал, что через 4 суток хранения наблюдается резкое увеличение доли необратимо активированных тромбоцитов (CD62P-положительных) тромбоцитов на фоне очень низкого числа апоптотических клеток в ТК (Таблица 4) в течение всего срока наблюдения. Эти данные позволяют заключить, что выявление аннексин V-положительных тромбоцитов не позволяет адекватно оценить качество клеток ТК. Количество CD62P-положительных тромбоцитов напрямую не коррелирует с параметром ФАТ, и практически не меняется в течение 2 суток хранения. Таким образом, определение ФАТ представляется наиболее чувствительной для оценки качества тромбоцитов в процессе хранения.

Таблица 4 – Оценка качества тромбоцитов в процессе хранения ТК

Срок хранения, сут	Общее количество тромбоцитов, $\times 10^9$ /дозе M $\pm$ $\sigma$	Относительное содержание ФАТ, % M $\pm$ $\sigma$	Общее количество ФАТ, $\times 10^9$ /дозе M $\pm$ $\sigma$	CD62P-положит. тромбоциты, % M $\pm$ $\sigma$	Аннексин V-положит. тромбоциты, % M $\pm$ $\sigma$
0 (контроль) (n=224)	250 $\pm$ 21	52 $\pm$ 5	130 $\pm$ 10	9 $\pm$ 3	1,0 $\pm$ 1,0
1 (n=259)	250 $\pm$ 20	44 $\pm$ 7*	110 $\pm$ 70*	9 $\pm$ 3	1,1 $\pm$ 0,2
2 (n=330)	260 $\pm$ 21	38 $\pm$ 7**	100 $\pm$ 30**	9 $\pm$ 2	3,0 $\pm$ 1,0
3 (n=271)	250 $\pm$ 20	20 $\pm$ 8***	50 $\pm$ 10***	10 $\pm$ 3	3,3 $\pm$ 0,9
4 (n=215)	270 $\pm$ 29	12 $\pm$ 7 <sup>#</sup>	32 $\pm$ 9 <sup>##</sup>	64 $\pm$ 10 <sup>#</sup>	2,0 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>
5 (n=239)	250 $\pm$ 22	0,8 $\pm$ 1 <sup>##</sup>	2 $\pm$ 2 <sup>##</sup>	72 $\pm$ 11 <sup>##</sup>	4,2 $\pm$ 0,7 <sup>##</sup>
<p>P<math>\leq</math>0,05 * - относительно контроля ** - относительно 1 суток хранения *** - относительно 2 суток хранения <sup>#</sup> - относительно 3 суток хранения <sup>##</sup> - относительно 4 суток хранения</p>					

## **Глава 4. Разработка способа криоконсервирования тромбоцитов с учетом морфофункциональных характеристик клеток**

Изучение возможности длительного хранения тромбоцитов ведется более 50 лет, однако до сих пор экспериментальные разработки не находили широкого клинического применения. Это связано с целым рядом проблем: 1) сложность выбора адекватного КП для работы с тромбоцитами человека; 2) проблема стандартизации и автоматизации этапов КК ТК; 3) отсутствие эффективного способа оценки качества тромбоцитов ТК. КП на основе ДМСО считаются «золотым стандартом» для криохранения клеток человека. Однако в случае тромбоцитов методика использования ДМСО до сих пор не оптимизирована. Неоднократно показано, что при одном и том же способе КК ТК с ДМСО сохранность функционально полноценных тромбоцитов может сильно варьировать. Авторы предлагают несколько подходов к КК тромбоцитов с помощью ДМСО [25, 84, 170]. Поэтому необходимо было оценить качество ТК, КК разными способами, с учетом морфофункциональных характеристик клеток в их составе.

### **4.1 Оценка эффективности существующих способов криоконсервирования тромбоцитов**

В ходе исследования апробировали 3 известных способа КК тромбоцитов с использованием ДМСО [25, 84, 170]. Характеристика методов КК детально описана в Главе 2. Показано, что при всех способах КК общее количество тромбоцитов в ТК снижается на 20-30% (Таблица 5).

Таблица 5 – Сравнительная характеристика тромбоцитов в ТК до и после КК разными способами

Параметры	Исходный ТК	ТК после КК и разморозки		
		1-ый способ [84] (n=15)	2-ой способ [170] (n=15)	3-ий способ [25] (n=15)
Количество тромбоцитов в ТК, $\times 10^9$ /дозе	257 $\pm$ 10	181 $\pm$ 7*	202 $\pm$ 9*	199,9 $\pm$ 16*
Сохранность общего числа тромбоцитов после размораживания, %	100	71 $\pm$ 7	79 $\pm$ 8	78 $\pm$ 12
pH КТК после размораживания	7,2 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,05*	7,0 $\pm$ 0,1*	7,3 $\pm$ 0,05
Осмолярность КТК после размораживания, мОсмоль/л	317 $\pm$ 3,9	485 $\pm$ 33,3*	479 $\pm$ 62*	414 $\pm$ 11*
Содержание ФАТ, %	51,9 $\pm$ 6,6	31,5 $\pm$ 10,1*	15,4 $\pm$ 3,0*	29,2 $\pm$ 7,3*
Общее количество ФАТ $\times 10^9$ /дозе	133,4 $\pm$ 0,7	57,1 $\pm$ 0,7*	31,1 $\pm$ 0,3*	58,4 $\pm$ 1,2*
Сохранность ФАТ, %	--	43 $\pm$ 3	23 $\pm$ 5	44 $\pm$ 3
*p<0,05 относительно исходных ТК				

Осмолярность всех РТ была достоверно выше значений исходных ТК, составляя 400–600 мОсмоль/л и во всех случаях превышала норму (300-380 мОсмоль/л). Во всех КТК отмечено заметное сокращение числа ФАТ. После методик 1 и 3 относительное содержание ФАТ (исходно 51,9 $\pm$ 6,6%) снижалось в среднем в 1,6-1,7 раза, а после метода 2 – в 3,3 раза; общее количество ФАТ в ТК (133,4 $\pm$ 0,7  $\times 10^9$ / в исходной дозе) уменьшалось в 2,3 и 4,2 раза соответственно (Таблица 5). Во всех 3-х методах сохранность ФАТ после КК была достоверно меньше 50%, (23-44%). Таким образом, проведенные исследования показали, что анализируемые методы КК с использованием ДМСО не позволяют заготавливать высококачественные КТК.

## 4.2 Влияние различных концентраций диметилсульфоксида и времени экспозиции на качество тромбоцитов

КК ТК независимо от технологии включает этап до заморозки, когда КП вводится в среду с тромбоцитами, этап заморозки и криохраниения, разморозку и хранение РТ. До и после криохраниения эндогенный КП – ДМСО – может оказывать повреждающее действие на тромбоциты. В связи с этим необходимо было исследовать влияние разных концентраций ДМСО на качество тромбоцитов в процессе их экспозиции при комнатной температуре. В нашей работе определяли концентрацию ФАТ в ТК, экспонированных в присутствии 0,5-20% ДМСО. Было установлено, что при 0,5% ДМСО содержание ФАТ в ТК практически не менялось в течение 2 часов при комнатной температуре, через 4 часа снижалась на 7-10%, через 20 часов – на 70% (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние различных концентраций ДМСО и времени экспозиции на качество тромбоцитов ТК

Концентрация ДМСО в ТК***%	Относительное содержание ФАТ (%) в ТК при экспозиции с ДМСО и температуре 20-22°C					
	0 мин	30 мин	1 час	2 часа	4 часа	20 часов
0,5	50±5	48±4	48±3	46±4*	45±6*	15±2*
1	49±5	47±4	44±5*	26±3*	18±2*	0*
2	50±5	45±4*	40±5*	25±5*	14±2*	0*
5	50±5	25±4*	20±3*	15±2*	0*	-
10	49±5	10±1*	3±1*	0*	-	-
20	50±5	0*	0*	-	-	-

\*p<0,05 относительно исходного значения (0 мин) \*\* в каждой серии по 7 образцов ТК

При концентрации ДМСО 1% и 2 % динамика снижения числа ФАТ была сходной: через 1 час потеря ФАТ составила 10-20%, через 2 часа – 40-50%, через 4 часа – от 60 до 80%, через 20 часов ФАТ в ТК полностью отсутствовали (Рисунок 7).

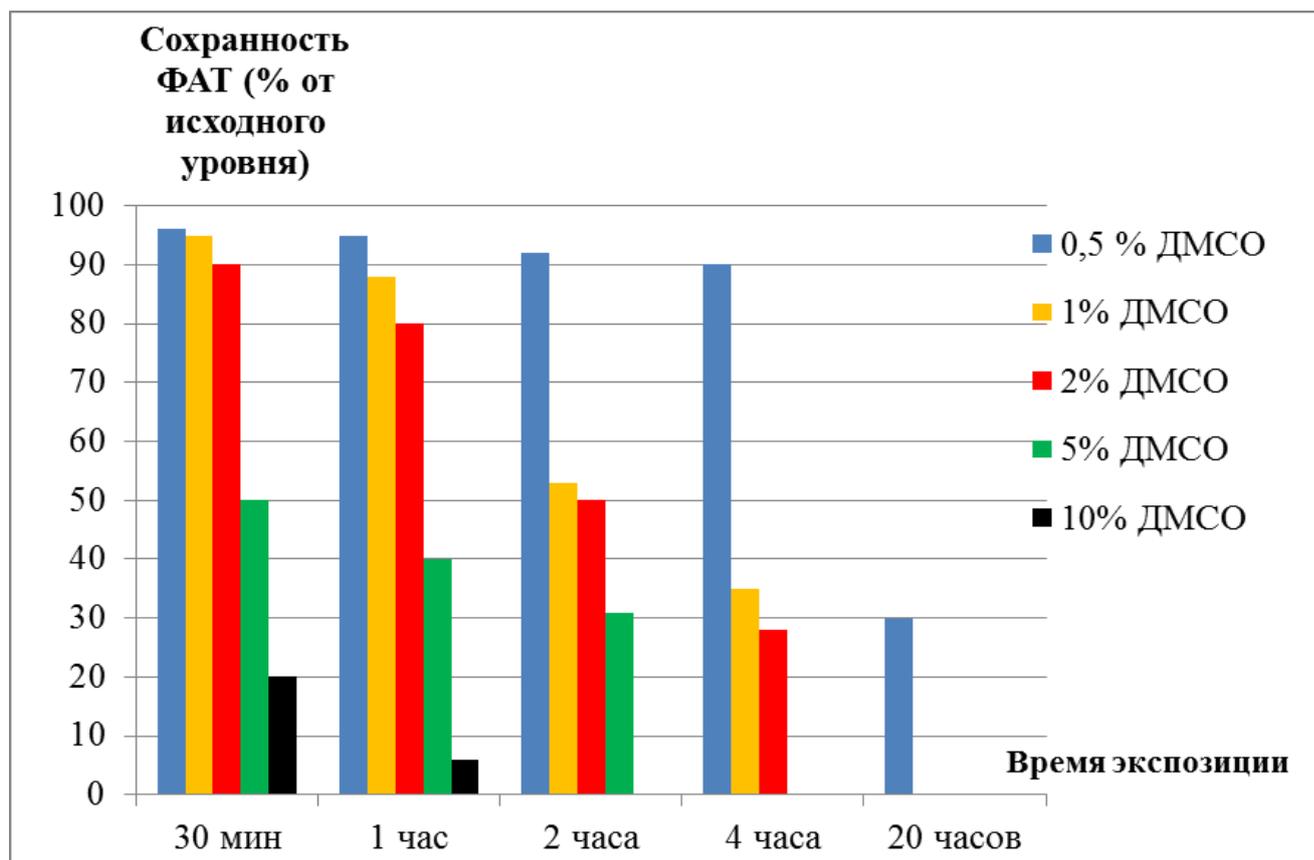


Рисунок 7 – Сохранность ФАТ в ТК в процессе экспозиции с разными дозами ДМСО при температуре 20-22°C

При 5% ДМСО динамика потери ФАТ тромбоцитами резко увеличивалась: через 30 мин экспозиции сохранность ФАТ составляла в среднем не более 50%, через 1 час – 40%. Еще более выраженной динамика снижения ФАТ была при 10% ДМСО: через 30 минут потеря ФАТ составила 80%, через 1 час – 95%, через 4 часа – 100%. В присутствии 20% ДМСО все тромбоциты потеряли функциональную активность уже через 30 мин экспозиции. Концентрация 5-6% ДМСО считается наиболее адекватной для КК тромбоцитов; однако на рисунке 8 отчетливо видно, что в присутствии 5% ДМСО ТК теряют 50% от всего количества ФАТ уже через 30 мин экспозиции.

Следовательно, при подготовке ТК к заморозке время контакта тромбоцитов с 5% ДМСО при комнатной температуре должно быть минимизировано. При концентрации 0,5% ДМСО биологическая полноценность тромбоцитов практически не нарушалась в течение нескольких часов. Итак, можно заключить,

что существует возможность хранения ТК в присутствии 0,5% ДМСО, при этом не происходит быстрого уменьшения ФАТ.

#### **4.3 Обоснование к совершенствованию метода криоконсервирования тромбоцитов**

Морфофункциональный анализ клеток ТК, КК с ДМСО разными способами, оценка качества тромбоцитов в присутствии разных концентраций ДМСО в условиях разного срока хранения при комнатной температуре, показали, что взаимодействие тромбоцитов и КП вызывает заметное нарушение их функциональной активности. В этой связи для оптимизации КК тромбоцитов с ДМСО предложено разработать процедуру КК ТК, при которой были бы решены следующие задачи:

- сокращение времени контакта тромбоцитов с КП до заморозки;
- уменьшение объема КП, вводимого в ТК;
- значительное снижение концентрации КП в КТК после разморозки посредством разведения;
- сохранение как можно большего числа ФАТ.

Выбран комбинированный стерильный КК раствор, содержащий 55% ДМСО (эндоцитарный КП) и 5% декстран (экзоцитарный КП), который позволяет сохранять как внутриклеточные структуры, так и структуры на поверхности плазматической мембраны в процессе КК. Вводить КП в ТК предложено после удаления из ТК бесклеточной плазмы. Разделение исходного ТК на тромбоцит-содержащую часть и бесклеточную плазму осуществляли путем центрифугирования ТК с ускорением 1250 g. Ранее нами было показано, что центрифугирование ТК с ускорением от 500 до 2000 g значимо не влияет на качество тромбоцитов [37]. Обосновано, что ускорение в 1250 g является адекватным для отделения тромбоцитсодержащей массы от бесклеточной плазмы; при этом функциональная активность тромбоцитов в ТК не снижается. Объем

полученной тромбоцитсодержащей массы в наших исследованиях составлял 10-15 мл, в которую после ресуспендирования вносили комбинированный КП на основе ДМСО и декстрана. На первом этапе исходный КП в объеме 1-3 мл смешивали с 10-15 мл бесклеточной плазмы ТК, полученный раствор вводили в тромбоцитсодержащую часть ТК. Введение раствора с КП осуществляли по 2 мл через каждые 2 минуты при постоянном перемешивании содержимого мешка. Общая продолжительность этой процедуры составила 8-12 мин, что в 2,5-3,0 раза меньше, чем в методе R. Valeri и соавт. [170]. Конечная концентрация ДМСО в суспензии тромбоцитов варьировала от 5 до 6%. После введения КП тромбоцитсодержащую часть ТК замораживали при минус 80°C. КТК и бесклеточную плазму хранили в морозильной камере при температуре минус 85°C или в жидком азоте при температуре минус 196°C в течение 100-900 суток. После разморозки КТК разведение тромбоцитов осуществляли с помощью бесклеточной плазмы из того же ТК. Объем размороженной плазмы составлял 180-200 мл, что позволяло развести тромбоцитсодержащую часть ТК в 10-11 раз, снижая конечную концентрацию ДМСО в ней до 0,4-0,6%.

Анализ качества тромбоцитов в РТ проводили непосредственно после разморозки, а также в течение 4 часов хранения при температуре 20-24°C и непрерывном помешивании. В КТК, КК по предложенной технологии, содержание ФАТ заметно не менялось в течение 4 часов, тогда как при консервировании (по методу R. Valeri и соавт.) уже через 30 мин наблюдалось резкое падение (на 40%) качества тромбоцитов (Рисунок 8) [170]. Таким образом, предложенная методика КК тромбоцитов позволяет иметь запас времени до трансфузии размороженных клеток.

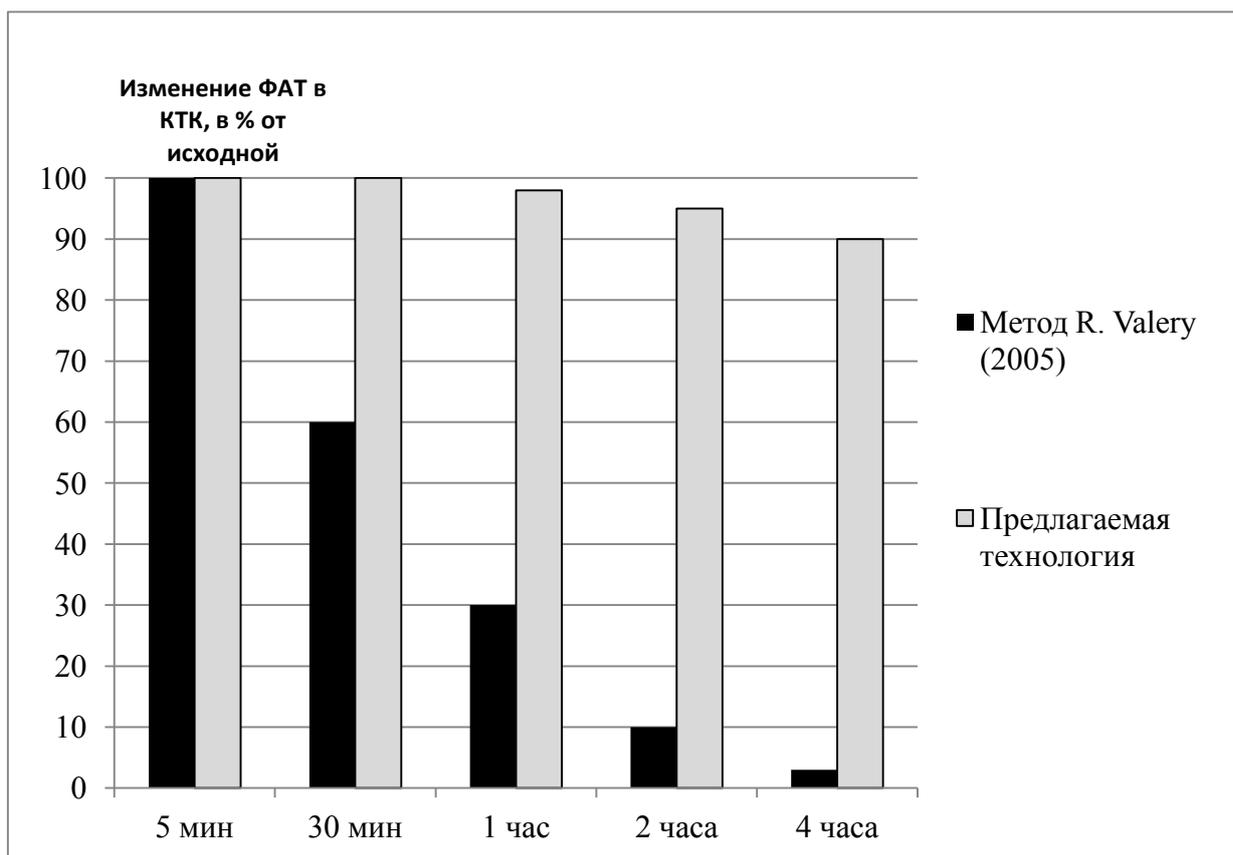


Рисунок 8 – Сравнение двух методов КК тромбоцитов по изменению содержания ФАТ в РТ в процессе хранения при температуре от 20 до 24 °С

#### 4.4 Влияние качества исходных тромбоцитных концентратов на сохранность тромбоцитов после криоконсервирования

Для КК могут быть использованы любые ТК. Однако предыдущие исследования показали, что качество тромбоцитов в ТК претерпевает значительные изменения в ходе хранения (Глава 3). В этой связи проведена оценка качества тромбоцитов ТК после хранения при температуре от +20 до +24°С и последующего КК методом, разработанным в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» (Таблица 7).

Таблица 7 – Оценка качества тромбоцитов ТК на разных сроках хранения и последующего КК клеток

Время после получения ТК, сутки	Общее содержание тромбоцитов в ТК, $\times 10^9$ /дозе M $\pm$ $\sigma$		Содержание ФАТ в ТК, $\times 10^9$ /дозе M $\pm$ $\sigma$		Сохранность ФАТ, % M $\pm$ $\sigma$
	До КК	После КК	До КК	После КК	
0 (n=50)	250 $\pm$ 7	238 $\pm$ 5	122 $\pm$ 8	79 $\pm$ 9	64 $\pm$ 5
1 (n=50)	251 $\pm$ 6	234 $\pm$ 7	117 $\pm$ 7	74 $\pm$ 12	63 $\pm$ 5
2 (n=50)	248 $\pm$ 6	229 $\pm$ 8	99 $\pm$ 8	47 $\pm$ 10	47 $\pm$ 5
3 (n=50)	250 $\pm$ 10	230 $\pm$ 9	59 $\pm$ 7	15 $\pm$ 9	25 $\pm$ 2
4 (n=50)	245 $\pm$ 8	230 $\pm$ 0,7	28 $\pm$ 4	3 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2
5 (n=50)	240 $\pm$ 7	229 $\pm$ 8	3 $\pm$ 3	0	0

Установлено, что общее содержание тромбоцитов в ТК существенно не менялось после КК, независимо от срока предварительного хранения ТК при комнатной температуре. Напротив, сохранность ФАТ в ТК разных суток хранения значительно различалась. ТК в день афереза и ТК через 1-и сутки хранения в среднем давали весьма высокую сохранность ФАТ (63-64%). КК ТК 2-х суток было уже менее эффективным, однако позволяло сохранить до половины всего исходного количества ФАТ. При консервировании ТК 3 суток сохранность ФАТ уже не превышала 25%, при консервировании ТК 4 суток – 11% (Таблица 7). В ТК 5 суток после КК ФАТ не выявлялись. Особо отметим, что сохранность ФАТ практически не зависела от сроков криохранения тромбоцитов. После 100-200 суток КТК сохраняли в среднем 54% ФАТ, через 201-500 суток – 51%, через 501-

699 суток – 52%, через 700-900 суток – 53%. Таким образом, срок хранения ТК, консервированных предложенным способом, может быть увеличен до 36 месяцев. Стоит отметить, что наибольшая сохранность ФАТ отмечена в ТК, где общее содержание тромбоцитов исходно составляло  $200-250 \times 10^9$ /дозе, относительное содержание ФАТ – 50-75%, общее содержание ФАТ –  $100-180 \times 10^9$ /дозе. В таких ТК сохранность ФАТ варьировала от 40 до 70%, составляя в среднем  $52 \pm 4\%$ .

Морфофункциональный анализ тромбоцитов показал, что ТК, исходно содержавшие более 50% ФАТ, после КК сохраняли не менее половины от общего количества ФАТ в ТК после КК (Рисунок 9).



Рисунок 9 – Распределение ТК по сохранности ФАТ после КК

В ТК с исходным уровнем ФАТ 30-40% (в пределах нижней границы нормы) сохранялось в среднем 31% от общего количества ФАТ. В ТК, где исходная концентрация ФАТ была ниже нормы (менее 30%), сохранность ФАТ после КК не превышала 10%. Таким образом, наиболее предпочтительными для КК являются ТК, содержащие 50-75% ФАТ.

#### 4.5 Оценка pH и осмолярности в исходных тромбоцитных концентратах и в криоконсервированных тромбоцитах после размораживания

Значение pH в ТК является маркером метаболических изменений в ТК, косвенным показателем жизнеспособности тромбоцитов и бактериальной контаминации [36]. Измерение pH в исходных ТК и в КТК, размороженных и разведенных плазмой или SSP+, проводили неинвазивным методом в закрытой системе с помощью прибора VCSI pH1000. Закрытая система позволяет избежать выделения CO<sub>2</sub>, при измерении pH, без нарушения герметичности контейнера, содержащего ТК. Результаты pH-метрии показали, что в процессе хранения pH в ТК постепенно повышался – с 7,11 в день получения ТК до 7,43 на 3 сутки хранения. На 4 и 5 сутки pH незначительно снижался, составляя 7,32 и 7,37 соответственно. В КТК, ресуспендированных размороженной плазмой, значение pH составляло 7,1-7,2 и было сопоставимо с ТК в день заготовки. Напротив, при разведении SSP+, pH КТК варьировал от 6,7 до 6,9 и был достоверно ниже нормального. Таким образом, разведение тромбоцитсодержащей фракции КТК с помощью бесклеточной плазмы, удовлетворяет требованиям Технического Регламента. При проведении трансфузионной терапии большое значение имеет мониторинг осмотических свойств крови. В связи с этим возникает необходимость оценки осмолярности ТК, полученных в процессе КК. В исходных ТК значение осмолярности составляло в среднем 312±24 мОсмоль/л, что соответствует норме (300-380 мОсмоль/л). В РТ после разведения плазмой осмолярность составила 393±25, т.е. в среднем был близок к верхней границе нормы. В то же время, при разведении КТК с помощью SSP+ осмолярность составила 402±17, и была достоверно выше, чем при разведении КТК плазмой (p<0.05). Таким образом, ресуспендирование РТ в плазме наиболее предпочтительно по сравнению с разведением РТ раствором SSP+.

#### 4.6 Разработка устройств для криоконсервирования тромбоцитов

Известные устройства для КК клеток крови, (зарубежные Fresenius, Baxter, Masopharma, Origen, российские Виробан) обеспечивают только замораживание и хранение биологического материала и не позволяют проводить технологические процессы в закрытом контуре, повышая риск микробной контаминации обрабатываемого биологического объекта. Для повышения качества получаемых КТК разработано два устройства, представляющие собой асептические закрытые системы, позволяющие проводить обработку ТК во время КК не нарушая герметичности.

Были разработаны устройства для КК тромбоцитов (патент на полезную модель № 169578, № 169287). Формулы изобретений представлены в Приложении А и Б. Устройства представляют замкнутую систему, состоящую из последовательно соединенных трубками контейнеров, предназначенных для: хранения исходных ТК, хранения плазмы, фракционирования и хранения тромбоцитсодержащей части (рисунок 10). Дополнительно к системе в стерильных условиях, в ламинарном шкафу, подсоединяют шприц с КП для последующего автоматизированного ресуспендирования тромбоцитсодержащей части КП. Перед замораживанием контейнеры отделяют друг от друга стерильным герметичным запаиванием трубок и замораживают при температуре от минус 80 до минус 100°С.

С помощью устройств криоконсервировали более 800 доз ТК. Разработанные устройства позволили автоматизировать процесс производства КТК, создать повторяемость и однородность технологического процесса, исключить риск микробной контаминации.

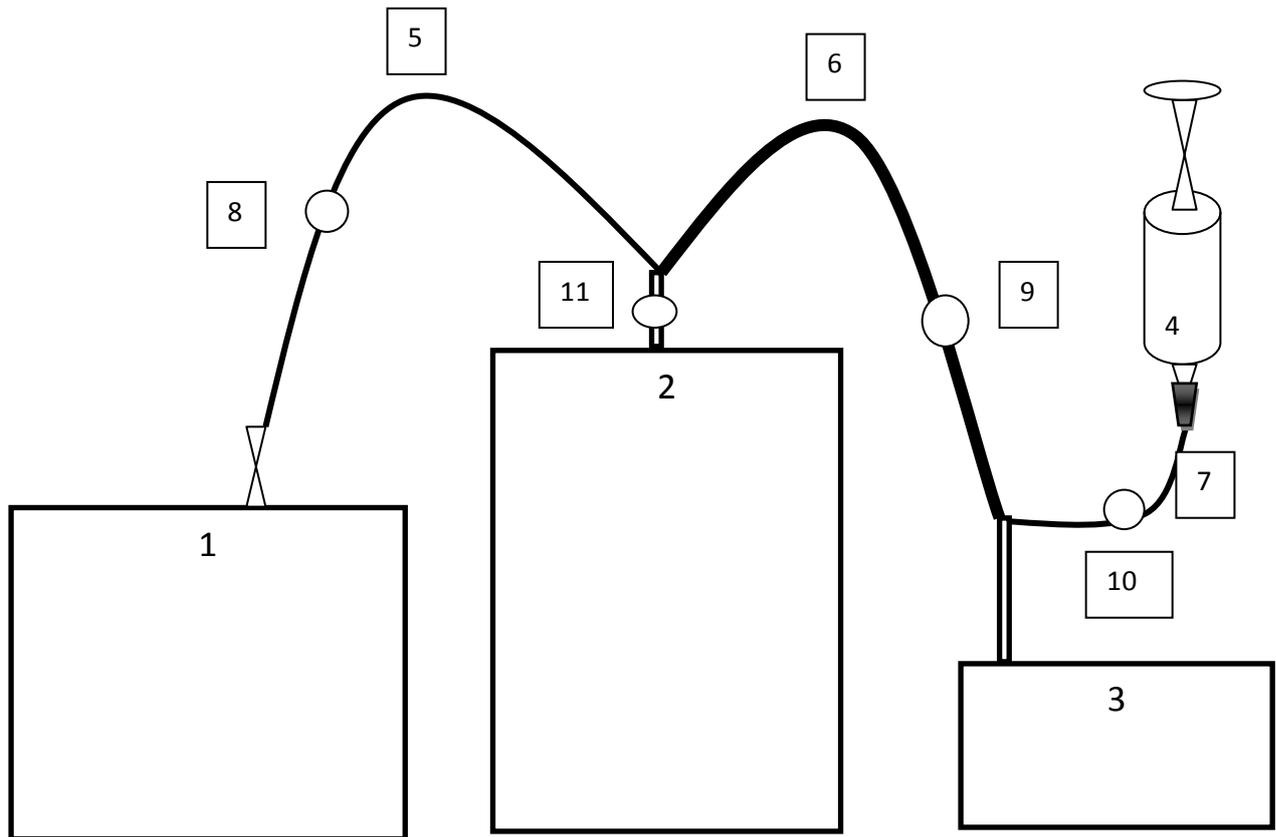


Рисунок 10 – Схема устройства для КК тромбоцитов. Обозначения: 1 – первый контейнер для исходного ТК, 2 – второй контейнер для хранения плазмы, 3 – третий контейнер для фракционирования ТК и последующего хранения КТК, 4 – шприц для введения КП, 5 – трубка, соединяющая первый контейнер со вторым, 6 – трубка, соединяющая второй контейнер с третьим, 7 – трубка соединения со шприцом через разветвитель, 8, 9, 10, 11 – зажимные элементы (зажимы)

Однородность и воспроизводимость технологии повышает производительность труда, сокращает трудозатраты. Кроме того, эти устройства позволяют сократить время технологического процесса КК на этапе от подготовки ТК к КК до размещения криоконтейнера с гемокомпонентом в морозильной камере.

#### **4.7 Разработка устройства для подготовки криоконсервированных тромбоцитов к трансфузии**

Для повышения качества получаемых РТ разработано устройство для

подготовки КТК к трансфузии. Заявляемое устройство представляет собой асептический закрытый контур, позволяющий контролируемо проводить ресуспендирование РТ, не нарушая герметичности всей системы.

Устройство для подготовки КТК к трансфузии сконструировано с использованием современных расходных материалов, зарегистрированных в РФ (патент на полезную модель № 167874). Формула изобретения представлена в Приложении В. Разработанное устройство представляет замкнутую систему, состоящую из последовательно соединенных трубками контейнеров, предназначенных для хранения РТ (контейнер 1), размещения размороженной плазмы (контейнер 2), ресуспендирования КТК (контейнер 3) (Рисунок 11). Дополнительно между вторым и третьим контейнерами интегрирован регулятор скорости для автоматизированного добавления плазмы и ресуспендирования тромбоцитов. После окончания ресуспендирования РТ переводят в контейнер 1 и отделяют его от других стерильным герметичным запаиванием трубок.

С использованием устройства для подготовки КТК к трансфузии разморожено и ресуспендировано более 240 доз КТК. Разработанное устройство позволило выполнить весь технологический процесс в замкнутом контуре, добиться высокого качества РТ и исключило вероятность микробной контаминации ТК. Контроль качества РТ показал высокую сохранность не только общего числа тромбоцитов (более 80%), но и ФАТ (более 50%).



замораживали со скоростью 1-3<sup>0</sup>/мин и хранили при температуре минус 85<sup>0</sup>С до 24 месяцев. Разморозку КТК осуществляли с помощью системы Barkey plasmatherm при температуре 37<sup>0</sup>С в течение 10 минут. Подготовку РТ к трансфузии проводили в замкнутой системе как автоматизировано, с использованием устройства с регулятором скорости Exadrop<sup>®</sup>, так и капельно. Ресуспендирование РТ плазмой в течение 10-15 минут с использованием устройства с регулятором скорости Exadrop<sup>®</sup> позволило автоматизировать процесс и исключить участие врача. Благодаря разработанным устройствам КК ТК занимало не более 40 минут, замораживание КТК длилось не более 2 часов, а подготовка КТК к трансфузии – не более 30 минут.

Применение перфузора с перемешивателем и устройства с регулятором скорости Exadrop<sup>®</sup> обеспечило контролируемое изменение осмолярности. Использование замкнутой системы исключило риск микробной контаминации. Разработанная аппаратная технология позволила снизить трудозатраты суммарно в 10 раз, обеспечить воспроизводимость технологии и обеспечить высокое качество КТК.

#### **4.9 Принцип разработанного метода криоконсервирования тромбоцитов**

Разработана автоматизированная технология КК тромбоцитов с использованием современного оборудования и расходных материалов, зарегистрированных в РФ (патенты на изобретения №: 2623081, 2623083, 2623864). Формулы изобретений представлены в Приложении Г, Д и Е. Высокое качество КТК получено с использованием новых технических решений:

1. Используются криоконтейнеры из этилвинилацетата Cryostore<sup>™</sup> CS (OriGen Biomedical GmbH, USA) и MACO BIOTECH Freezing EVA bags, не активирующие тромбоциты и сохраняющие герметичность при ультранизких температурах во время замораживания и хранения КТК.

2. Разработаны устройства для КК тромбоцитов и подготовки КТК к трансфузии, обеспечивающие замкнутый контур и исключают риск микробной контаминации (патенты на полезные модели №: 167874, 169287, 169578).

3. Использован комбинированный КП на основе ДМСО CryoSure-Dex40, разрешенный для медицинского использования (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие № РЗН 2014/1921 от 03 сентября 2014 года).

4. Бинарная система в КТК, состоит из концентрата тромбоцитов и плазмы, полученных от одного донора.

5. Перед замораживанием введение гипертонического КП в концентрат тромбоцитов проводится аппаратно, с использованием перфузора.

6. Скорость введения изотонической плазмы и ресуспендирование гипертонического размороженного концентрата тромбоцитов контролируется регулятором скорости инфузионной системы.

7. Разработанная технология позволяет хранить КТК как в морозильной камере при температуре минус  $85^{\circ}\text{C}$ , так и в жидком азоте при температуре минус  $196^{\circ}\text{C}$  не менее 3 лет без потери ФАТ.

8. Транспортировка замороженных КТК проводится в герметичных термоконтейнерах с использованием сухого льда при температуре минус  $78^{\circ}\text{C}$ .

Помимо новых технических решений разработанная технология КК тромбоцитов имеет технологические особенности:

1. Исходный ТК должен иметь концентрацию тромбоцитов не более 1,5 млн./мкл и объем 200 мл.

2. Для обеспечения высокой сохранности ФАТ следует рассчитывать эффективную концентрацию КП CryoSure-Dex40 с учетом удельной концентрации ДМСО.

3. Малое количество ДМСО (1,2 -1,3 г) в КТК не требует удаления КП после размораживания КТК.

4. Для ресуспендирования РТ не требуется использование донорской плазмы и разводящих растворов.

5. Готовые для трансфузии КТК не теряют ФАТ в течение 4 часов при температуре от 20 до 24<sup>0</sup>С и непрерывном помешивании на тромбомиксере.

#### 4.10 Объем производства и потребность ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» в тромбоцитных концентратах и криоконсервированных тромбоцитах

Морфофункциональное исследование клеток в ТК, полученных методом афереза, анализ взаимодействия тромбоцитов с КП, оценка качества КТК позволили разработать и внедрить технологию длительного хранения тромбоцитов в практику в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

В ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» заготовку ТК проводили методом афереза с использованием клеточных сепараторов Trima Accel. С 2011 по 2018 гг. наблюдали устойчивый рост объемов заготовки ТК, полученных методом афереза. В 2011 году получено 450 доз ТК, а в 2018 году 1400 доз (Рисунок 12).

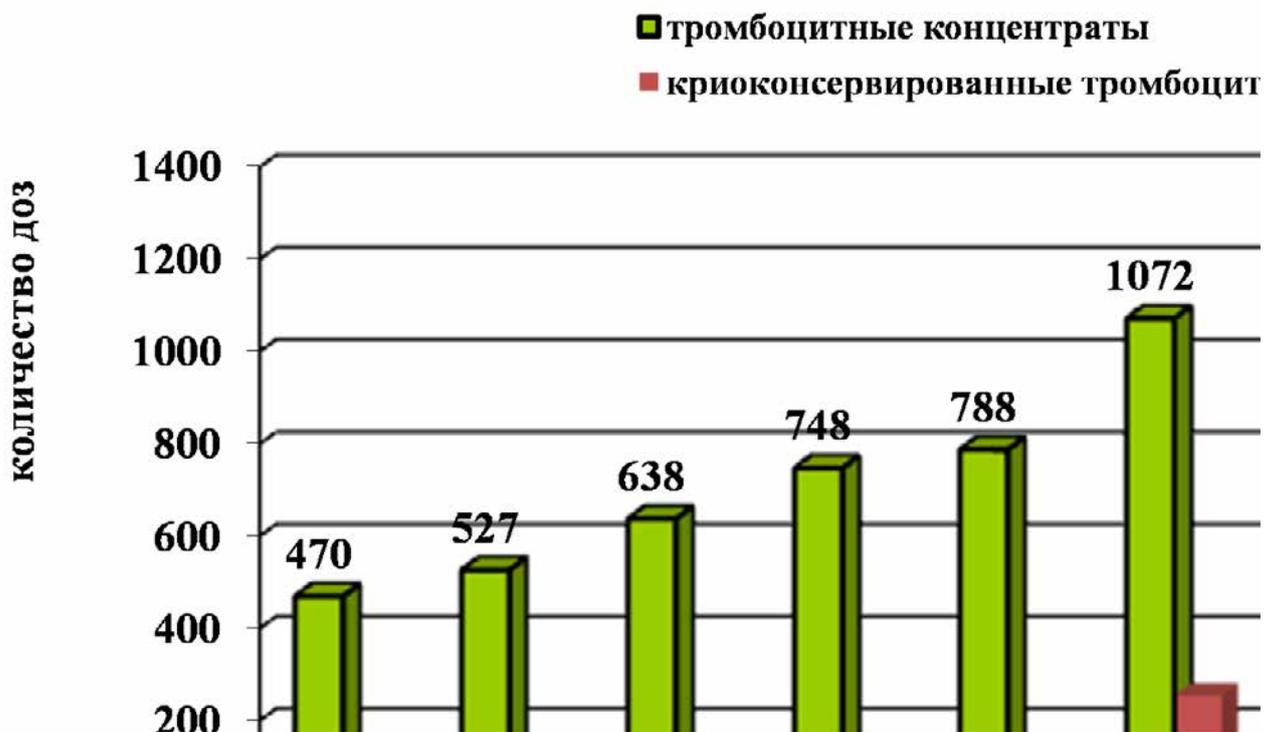


Рисунок 12 – Производство ТК в ГБУЗ «НИИ СП им. Склифосовского ДЗМ» с 2011 по 2018 гг.

Трансфузии ТК наиболее часто проводили пациентам после трансплантации органов, кардиохирургических и нейрохирургических операций, а также больным с сочетанной травмой.

Кроме того, осуществляется передача тромбоцитных компонентов в другие ЛПУ г. Москвы. При этом были выявлены риски, связанные с обеспечением клинических подразделений тромбоцитными компонентами. Во-первых, хранение ТК при комнатной температуре ограничено 5 сутками (с учетом потери времени при тестировании на инфекции – до 4 суток), что делает невозможным проведение карантинизации; во-вторых, невозможность банкировать тромбоцитные компоненты увеличивает риск дефицита ТК с редкими иммунным профилем; в-третьих, в условиях избытка ТК увеличивается доля компонентов, списанных по сроку хранения. Таким образом, внедрение методов длительного хранения ТК является чрезвычайно актуальной задачей.

В 2013 году началось внедрение разработанной технологии КК тромбоцитов. Производство КТК и их длительное хранение (до 24 месяцев) позволило управлять запасами, регулировать потоки доноров, проводить индивидуальный подбор ТК (исключить рефрактерность и сократить трансфузии), планировать ауторезервирование ТК. Длительное хранение КТК обеспечило их карантинизацию. Всего за период с 2013 по 2018 гг. получено 1188 доз КТК доз.

Первые трансфузии КТК проведены в 2013-м году. К концу 2018 года разморожено более 350 доз КТК. Все пациенты с трансфузиями КТК имели хирургическую патологию. Как и с ТК, наиболее интенсивно трансфузии КТК проводили пациентам с трансплантацией органов (30% от всех трансфузий ТК), у кардиохирургических (25%) и нейрохирургических (20%) больных (Рисунок 13).

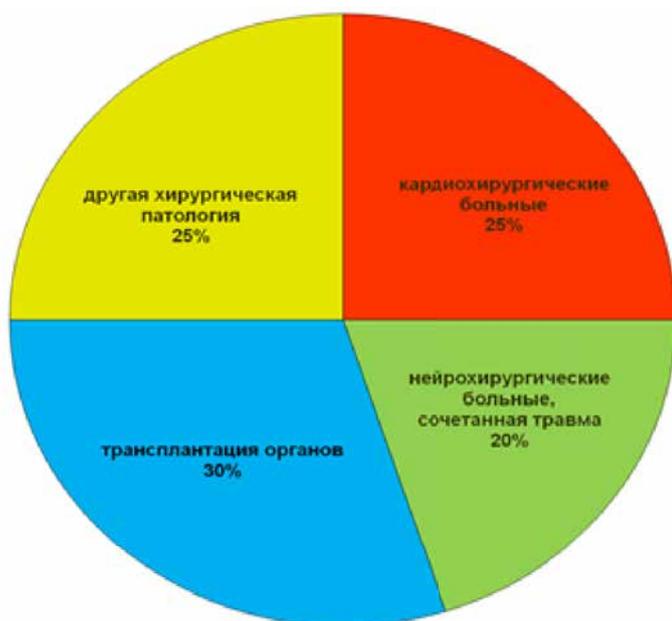


Рисунок 13 – Потребности клинических подразделений ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» в КТК

Кардиохирургическим больным переливание КТК проводили во время или после операций с использованием АИК (аортокоронарное шунтирование, маммарокоронарное шунтирование, протезирование клапанов). Нейрохирургическим больным переливали КТК во время и после операций на головном мозге при удалении гематомы, аневризмы сосудов и опухоли. У 91% пациентов трансфузии КТК проводили однократно, у 6% - потребовалась повторная трансфузия КТК, три и более трансфузии КТК проведены у 3% пациентов. Подробный анализ клинической эффективности КТК отражен в следующей Главе 5.

## **Глава 5. Оценка клинической эффективности и безопасности применения криоконсервированных тромбоцитов у больных с хирургической патологией**

Трансфузии тромбоцитных компонентов проводятся у пациентов с выраженной тромбоцитопенией или тромбоцитопатией, чтобы, с одной стороны, скорректировать клинически выраженный ГС, а с другой – повысить качество циркулирующих тромбоцитов для предотвращения возможных кровотечений. Однако при назначении трансфузий ТК и в отечественной, и в мировой практике до сих пор отсутствует оценка качества тромбоцитов пациентов, отражающая их морфофункциональные параметры. С учетом того, что только ФАТ могут эффективно участвовать в свертывании крови, чрезвычайно актуальным представляется морфофункциональный анализ тромбоцитов у пациентов до назначения трансфузии.

### **5.1 Оценка качества тромбоцитов у больных до трансфузии тромбоцитных концентратов**

У здоровых людей и доноров абсолютное и относительное содержание ФАТ в крови составляет  $134,0 \pm 20,0 \times 10^9/\text{л}$  и  $53,5 \pm 4,5\%$ . Показано, что при многих патологиях концентрация ФАТ в крови резко снижается по сравнению с таковыми у доноров. В связи с этим проведен анализ морфофункциональных параметров тромбоцитов у пациентов, нуждающихся в трансфузии ТК (клинически выраженные кровотечения, массивная кровопотеря). Установлено, что у всех таких пациентов содержание ФАТ в крови – как относительное, так и абсолютное – резко снижено по сравнению с донорами (Таблица 8).

Таблица 8 – Качество тромбоцитов в крови больных с кровотечениями до трансфузии ТК

Статистические показатели	Общая концентрация тромбоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	Относительное содержание ФАТ, %	Концентрация ФАТ, $\times 10^9/\text{л}$
<b>Кардиохирургические больные после операции протезирования клапанов сердца и восходящего отдела аорты с использованием АИК (n=20)</b>			
М $\pm$ σ	85,3 $\pm$ 7,5*	8,2 $\pm$ 1,2*	7,0 $\pm$ 2,2*
пределы	40-130	1-16	0,4-20
<b>Больные с сочетанной травмой и массивной кровопотерей (n=13)</b>			
М $\pm$ σ	67,2 $\pm$ 8,6*	7,7 $\pm$ 1,4*	5,2 $\pm$ 1,7*
пределы	20-96	2-12	0,1-10
<b>Больные с нейрохирургической патологией (n=10)</b>			
М $\pm$ σ	80,9 $\pm$ 7,9*	5,4 $\pm$ 1,0*	4,4 $\pm$ 2,2*
пределы	20-140	0-10	0-4
<b>Больные после трансплантации легких с ЭКМО и больные с ОПН и ХПН гемодиализацией (n=17)</b>			
М $\pm$ σ	58,5 $\pm$ 3,9*	5,3 $\pm$ 4,6*	3,2 $\pm$ 1,1*
пределы	30-100	0-9	0-8
<b>Доноры</b>			
М $\pm$ σ	258,0 $\pm$ 21,0	53,5 $\pm$ 4,5	134,0 $\pm$ 20,0
пределы	160-420	30-75	50-190
*p $\leq$ 0,05 относительно доноров			

У кардиохирургических больных и больных с сочетанной травмой концентрация в крови ФАТ (%) снижена в 6,5-6,9 раза, у нейрохирургических больных и пациентов после трансплантации органов – в 9,9-10 раз. У 50% пациентов наблюдалась выраженная тромбоцитопения (общая концентрация тромбоцитов составляла 20-60  $\times 10^9/\text{л}$ ), которая сочеталась с очень низким относительным содержанием ФАТ (0-9%). С другой стороны, у 25% пациентов на фоне ГС общая концентрация тромбоцитов в крови была выше  $100 \times 10^9/\text{л}$ , т.е. в данном случае выраженная тромбоцитопения отсутствовала. Однако при этом относительное содержание ФАТ у таких пациентов было низким, и в среднем, не превышал 7%. Ранее было показано, что при уровне ФАТ ниже 10% резко возрастает риск геморрагических осложнений. Таким образом, у представленных больных с хирургической патологией имелись основания в проведении коррекции клеточного звена гемостаза путем трансфузии ТК.

## 5.2 Примеры клинического использования тромбоцитных концентратов

Для коррекции тромбоцитопении и ГС обследованным больным проведены трансфузии лечебных доз ТК. Ниже представлены примеры по использованию ТК в клинической практике ГБУЗ «НИИ СП им Н.В. Склифосовского ДЗМ».

### Пример 1.

Больная Ф., 35 лет, с Диагнозом: Сепсис, закрытая черепно-мозговая травма, пневмония, субарахноидальная гематома, мозговая кома. Состояние после операции удаления внутричерепной гематомы.

*St. Pr. Object.* ИВЛ. Лихорадка  $38^{\circ}\text{C}$ . ГС II степени по шкале ВОЗ. Общая концентрация тромбоцитов в крови –  $39 \times 10^9/\text{л}$ . Концентрация ФАТ в крови – 2%. Анемия третьей-четвертой степени: Гемоглобин 68 г/л и гематокрит 19%. Лейкопения  $1,4 \times 10^9/\text{л}$ .

*Лечение.* Лечебная трансфузия ТК с учетом группы крови больного В(III).

*Характеристика ТК.* ТК хранили при комнатной температуре в течение 1 суток с момента заготовки. Объем ТК 200 мл, общее количество тромбоцитов –  $214 \times 10^9$  в дозе, содержание ФАТ в ТК – 50%.

*Эффективность трансфузии.* В результате трансфузии кровотечение остановлено, повторных кровотечений не наблюдалось. В крови больной общая концентрация тромбоцитов составила  $52 \times 10^9/\text{л}$  через 1 час и  $63 \times 10^9/\text{л}$  через 24 часа после окончания переливания ТК. Концентрация ФАТ в крови составила 12% и 20% соответственно. СПТ через 1 час составил  $18 \times 10^9/\text{л}$ , через 24 часа –  $8 \times 10^9/\text{л}$ , что соответствует принятой норме [123].

### Пример 2.

Больная Б., 57 лет, с Диагнозом: Первичная дегенерация створок митрального клапана. Отрыв хорд митрального клапана. Недостаточность митрального клапана. Атеросклероз аорты и ее ветвей. Состояние после операции пластики митрального клапана с использованием ИК.

*St. Pr. Object.* Сохраняется ГС из области операционной раны после ИК. Тромбоцитопения после ИК не выражена (общая концентрация тромбоцитов в крови –  $161 \times 10^9$ /л. Содержание ФАТ в крови – 2%. Анемия первой степени: гемоглобин 99 г/л и Hct 27%, лейкопения  $3,5 \times 10^9$ /л.

*Лечение.* Лечебная трансфузия ТК с учетом группы крови больной О (I).

*Характеристика ТК.* ТК хранили при комнатной температуре в течение 2 суток с момента заготовки. Объем ТК 200 мл, общее количество тромбоцитов –  $229 \times 10^9$  в дозе, концентрация ФАТ – 35%.

*Эффективность трансфузии.* В крови больного: концентрация тромбоцитов  $195 \times 10^9$ /л через 1 час и  $175 \times 10^9$ /л через 24 часа после окончания переливания ТК

В результате трансфузии кровотечение остановлено, повторных кровотечений не наблюдалось. Концентрация ФАТ в крови составила 19% и 18% соответственно. СПТ через 1 час составил  $26 \times 10^9$ /л, через 24 часа –  $10 \times 10^9$ , что соответствует принятой норме.

### **Пример 3.**

Больной Б., 58 лет, с Диагнозом: Цирроз печени. Состояние после трансплантации печени.

*St. Pr. Object.* Общая концентрация тромбоцитов в крови  $23 \times 10^9$ /л, концентрация ФАТ – 5%. Адекватный хирургический гемостаз. Серозно-геморрагическое отделяемое по дренажам из брюшной полости.

*Лечение.* Профилактическая трансфузия ТК с учетом группы крови больного В(III).

*Характеристика ТК.* ТК хранили при комнатной температуре в течение 3 суток с момента заготовки. Объем ТК 200 мл, общее количество тромбоцитов –  $220 \times 10^9$  в дозе, концентрация ФАТ – 17%.

*Эффективность трансфузии.* Серозно-геморрагическое отделяемое по дренажам сохранилось.

В крови больного общая концентрация тромбоцитов составила  $45 \times 10^9$ /л через 1 час и  $27 \times 10^9$ /л через 24 часа после окончания переливания ТК. Концентрация

ФАТ в крови составила 10% и 6% соответственно. СПТ через 1 час составил  $21 \times 10^9$ /л, через 24 часа –  $9 \times 10^9$ /л, что соответствует принятой норме.

В результате трансфузий ТК ГС был компенсирован в 90% случаев при использовании ТК 1-2 суток хранения и лишь в 30% случаев при использовании ТК 3-4 суток. Это может быть связано с тем, что после 2 суток хранения в ТК наблюдается резкое снижение содержания ФАТ. Через 24 часа после трансфузии ТК 1-2 суток относительное содержание ФАТ в крови пациентов после трансфузий возрастала в среднем в 3,5 раз, общая концентрация ФАТ – в 4,7 раз, тогда как при использовании ТК 3-4 суток это увеличение составило всего лишь 1,2 и 1,4 раз соответственно. В результате эффективность трансфузий ТК 3-4 суток была гораздо ниже, чем при трансфузии ТК 1-2 суток. В целом, трансфузии ТК 1-2 суток являются высоко эффективными. Однако использование ТК не позволяет проводить карантинизацию тромбоцитных компонентов, что постоянно создает риск передачи гемотрансмиссивных инфекций. Решить проблему карантинизации тромбоцитных компонентов можно лишь путем длительного хранения ТК в замороженном состоянии.

Стоит особо подчеркнуть, что при всех успешных трансфузиях концентрация ФАТ (%) в крови пациентов достоверно превышал 10% как через 1 час, так и через 24 часа после переливания ТК. Напротив, при неэффективных трансфузиях (когда ГС сохранялся) концентрация ФАТ у пациентов в 67% случаев была ниже 10%. У всех пациентов, которым потребовались повторные трансфузии, концентрация ФАТ в крови также была ниже 10%. Таким образом, параметр ФАТ является весьма чувствительным для оценки эффективности проводимой трансфузионной терапии. Оценка содержания ФАТ в крови до и после трансфузий дала возможность не только оценивать качество тромбоцитов пациента, но и определять клиническую эффективность доз ТК. Это позволило использовать морфофункциональный анализ тромбоцитов для оценки клинической эффективности КТК.

### 5.3 Оценка клинической эффективности криоконсервированных тромбоцитов

Для оценки клинической эффективности КТК провели трансфузии ТК 1-4 суток после заготовки и КТК обследованным больным с выраженной тромбоцитопенией и ГС (геморрагическое отделяемое по дренажам, петехиальная сыпь, постинъекционные кровоподтеки на коже), находящихся на лечении в хирургических и реанимационных отделениях ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Трансфузии КТК проводили непосредственно после размораживания. Средний размер трансфузионного пособия ТК и КТК значимо не отличался и составил  $1,2 \times 10^{11}$  тромбоцитов на  $1 \text{ м}^2$  поверхности тела больного. Общее содержание тромбоцитов в ТК составило  $250 \pm 20 \times 10^9$ /дозе, в КТК –  $230 \pm 18 \times 10^9$ /дозе. Общее содержание ФАТ в ТК 1-2 суток хранения составляла  $112 \pm 17 \times 10^9$ /дозе, в ТК 3-4 суток хранения –  $35 \pm 8 \times 10^9$ /дозе, в КТК –  $107 \pm 16 \times 10^9$ /дозе. После трансфузии КТК у пациентов не выявлено посттрансфузионных реакций и осложнений. Прекращение ГС отмечено в 70% случаев при трансфузии ТК и в 80% случаев при трансфузии КТК. После трансфузии ТК у 90% больных средние значения СПТ соответствовали норме, даже в тех случаях, когда трансфузии были неэффективными и кровотечение сохранялось. При трансфузии КТК средние показатели СПТ были достоверно ниже, чем при трансфузии ТК 1-2 суток и значимо не отличались от аналогичных значений при трансфузии ТК 3-4 суток. Однако концентрация ФАТ в крови после трансфузии КТК была достоверно выше, чем после трансфузий ТК 3-4 суток (Таблица 9) – в 2,4 раза через 1 час и в 1,9 раз через 24 часа ( $p < 0,05$ ). Значения ФАТ в крови после трансфузии КТК и ТК 1-2 суток хранения значимо не отличались (Таблица 9).

Таблица 9. Сравнительный анализ клинико-лабораторной эффективности клеточного звена гемостаза после трансфузии ТК и КТК

Параметры		Трансфузия ТК 1-х/2-х суток хранения (контроль 1) <i>n</i> =50	Трансфузия ТК 3-х/4-х суток хранения (контроль 2) <i>n</i> =40	Трансфузия КТК <i>n</i> =56
СПТ, $\times 10^9$ /л	Через 1 час после трансфузии (норма $\geq 7$ )	18,9 $\pm$ 3,6	9,2 $\pm$ 1,3*	10,8 $\pm$ 1,3*
	Через 24 часа после трансфузии (норма $\geq$ 4,5)	12,4 $\pm$ 7,1	5,3 $\pm$ 1,8*	5,2 $\pm$ 0,5*
Концентрация ФАТ в крови пациента, %	Через 1 час после трансфузии	24,9 $\pm$ 5,9	11,3 $\pm$ 2,2*	27,1 $\pm$ 4,9% **
	Через 24 часа после трансфузии	28,2 $\pm$ 6,4	14,6 $\pm$ 10,4*	28,0 $\pm$ 6,2**
<p><math>p &lt; 0,05</math> * по сравнению с контролем 1 ** по сравнению с контролем 2</p>				

Эффективность КТК отчетливо видна на примере пациентов с кардиохирургической патологией (Таблица 10). После трансфузии КТК в циркулирующей крови пациентов достоверно увеличивалось содержание ФАТ – в среднем в 2 раза через 1 час, и в 1,8 раза через 24 часа, при трансфузиях ТК рост ФАТ составил 1,8 и 1,9 раз соответственно. Таким образом, эффект от использования КТК был сопоставим с использованием ТК.

Таблица 10 – Эффективность переливания ТК и КТК у кардиохирургических больных

Тип тромбоцитных компонентов, использованных для трансфузии	Содержание ФАТ в крови пациента, %		
	До трансфузии	После трансфузии	
		Через 1 час	Через 24 часа
ТК	8,4±1,5	15,7±1,0*	16,2±1,1*
КТК	8,0±1,2	17,5±1,4*	15,8±1,4*

\*p<0.05 относительно содержания ФАТ до трансфузии ТК

Таким образом, морфофункциональный анализ тромбоцитов показал, что КТК, полученные по разработанной методике, имеют клиническую эффективность, сопоставимую с ТК. Необходимо особо подчеркнуть, что высокая клиническая эффективность (более 90%) наблюдался при использовании ТК с содержанием ФАТ  $80 \times 10^9$ /дозе и выше. Среди заготовленных доз такое содержание ФАТ отмечено в 84% ТК 1-2 суток хранения, в 73% КТК и лишь в 16% ТК 3-4 суток хранения. В результате прирост ФАТ в крови пациента был гораздо более выражен при использовании ТК 1-2 суток и КТК на фоне незначимых отличий по СПТ. Можно заключить, что параметр ФАТ гораздо точнее отражает эффективность трансфузии по сравнению с параметром СПТ. Оценка уровня ФАТ в крови пациентов до и после трансфузии подтвердила эффективность КТК, наблюдаемую клинически (прекращение ГС). Разработанная методика КТК позволяет проводить длительное хранение и карантинизацию тромбоцитных компонентов без значительной потери их функциональной активности.

#### **5.4 Карантинизация криоконсервированных тромбоцитов для обеспечения инфекционной безопасности гемокомпонентной терапии**

ТК ограничены коротким сроком хранения, до 5 суток, что не позволяет проводить повторное обследование донора по истечении серонегативного окна опасных гемотрансмиссивных инфекций. КК и длительное хранение тромбоцитных компонентов, до 2 лет, обеспечивает карантинизацию КТК и выбраковку гемокомпонентов по Гепатиту В и С, ВИЧ. Производство КТК является предпочтительным в связи с возможностью карантинизации и обеспечения инфекционной безопасности трансфузии тромбоцитных компонентов.

Карантинизацию КТК проводили по аналогии с СЗП в соответствие с принятыми НД в РФ. За период с 2013 по 2018 год было карантинизировано более 800 доз КТК. Карантин с КТК снимали после повторного обследования доноров на наличие вирусов: ВИЧ, Гепатит В и С – через 180 суток после заготовки крови. Помимо инфекций при выбраковке КТК учитывали повторное превышение АЛТ в 2 раза у доноров при обследовании. Большая часть РТ (70%), перелитых больным, прошла карантинизацию. Остальная часть (30%) была условно-карантинизирована – прошла карантинизацию уже после размораживания и выдачи компонента больным. Условная карантинизация обусловлена недостаточным количеством КТК в Криобанке (300 доз КТК) для индивидуального подбора «донор-реципиент» на момент размораживания компонентов. В результате проведенной карантинизации было изъято из хранения и утилизировано 39 доз (6%) КТК. Структура брака КТК следующая: превышение АЛТ в 2 раза и более (6 доз), положительный тест на HbsAg (9 доз), положительный тест на HCV (7 доз), положительный тест на ВИЧ (17 доз).

Замораживание и длительное хранение КТК позволило проводить их карантинизацию в связи с длительным сроком хранения – до 2-х лет. Карантинизация КТК обеспечила безопасность трансфузионной терапии за счет

выбраковки и утилизации образцов по гемотрансмиссивным инфекциям: HCV, HBV и HIV – а также по RW и АЛТ.

## **5.5 Клиническое применение криоконсервированных тромбоцитов в ЛПУ Владимирской и Тюменской области**

Высокие производственные и клинические показатели эффективности технологии КК тромбоцитов, разработанной в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», обеспечили высокий спрос и возможность ее внедрения в региональных станциях переливания крови РФ. Так в 2017-2018 гг. ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» заключили шесть лицензионных договоров. Первые результаты внедрения технологии КК тромбоцитов и клинического использования КТК получены на двух областных станциях переливания крови. На основании лицензионных договоров на использование изобретения и полезной модели (патенты: № 2623081, 2623083, 2623864, 169287, 169578 и 167874) ГБУЗ ВО ОСПК (г. Владимир) и ГБУЗ ТО ОСПК внедрили в производство технологию КК тромбоцитов, разработанную в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». Эти лицензионные договоры 2017Д26154 и 2017Д26153 зарегистрированы в Роспатенте, о чем свидетельствуют уведомления о государственной регистрации (Приложение Е и Ж). Оформлены акты о внедрении технологии КК тромбоцитов (Приложение З и И).

В результате внедрения технологии КК тромбоцитов в ГБУЗ ВО ОСПК и в ГБУЗ ТО ОСПК по состоянию на январь 2018 гг. заготовлено 264 и 96 доз КТК соответственно, разморожено и перелито больным 135 и 39 доз соответственно. К концу 2018 г. производственная активность в этих ЛПУ значимо увеличилась. К сентябрю 2018 г. в ГБУЗ ВО ОСПК (г. Владимир) заготовлено 434 дозы КТК, разморожено и перелито больным более 297 доз КТК. В ГБУЗ ТО ОСПК (г. Тюмень) заморожено 275 доз КТК, разморожено и перелито больным более 200 доз КТК.

Качество исходных ТК, заготовленных во всех ЛПУ, значимо не отличались ни по объему, ни по содержанию тромбоцитов. В ГБУЗ ВО ОСПК (г. Владимир) объем ТК составил  $200 \pm 20$  мл, а количество тромбоцитов –  $219 \pm 50 \times 10^9$ /дозе, в ГБУЗ ТО ОСПК (г. Тюмень)  $159 \pm 40$  мл и  $204 \pm 50 \times 10^9$ /дозе соответственно. Количество тромбоцитов в РТ составило:  $180 \pm 20 \times 10^9$ /дозе в ГБУЗ ВО ОСПК (г. Владимир) и  $182 \pm 72 \times 10^9$ /дозе в ГБУЗ ТО ОСПК (г. Тюмень). Сохранность тромбоцитов после размораживания составила более 80% по сравнению с исходными ТК.

Лечебные трансфузии РТ проведены уже в 2017 как в ГБУЗ ВО ОСПК, так и в ГБУЗ ТО ОСПК. Наиболее интенсивно в ЛПУ Владимирской области переливали РТ онкогематологическим больным (гематологическим больным ( $n=48$ ) и онкологическим ( $n=6$ )) (Рисунок 14). Наименьшая потребность в КТК была у хирургических больных: нейрохирургические ( $n=7$ ) и хирургические больные ( $n=7$ ).

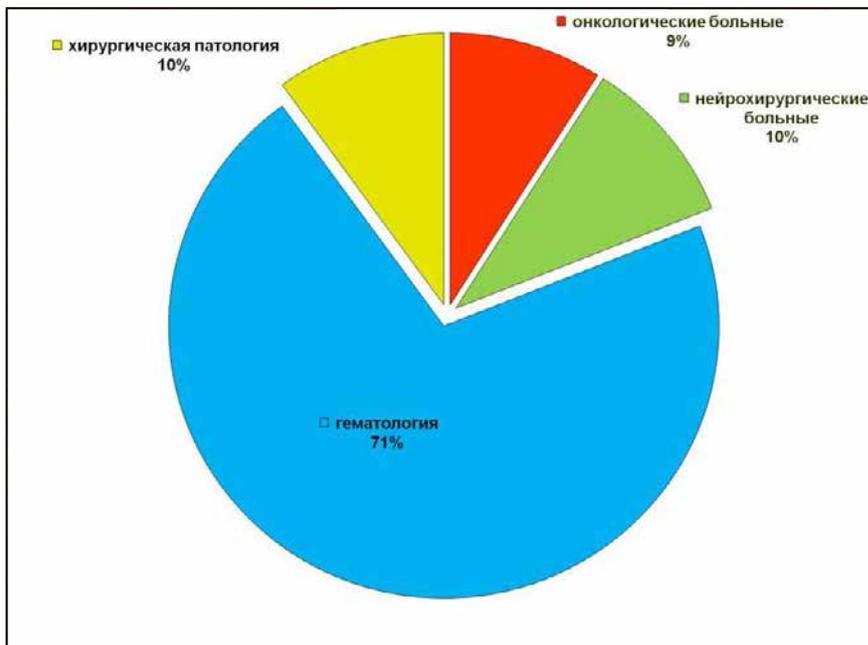


Рисунок 14 – Структура потребности КТК в ЛПУ Владимирской области

В ЛПУ Тюменской области КТК также преимущественно переливали онкогематологическим больным: гематологическим больным ( $n=49$ ), хирургическим ( $n=40$ ), онкологическим ( $n=10$ ), кардиохирургическим ( $n=9$ ),

больным после трансплантации почки ( $n=4$ ), недоношенным детям ( $n=9$ ), роженицам ( $n=2$ ) (Рисунок 15).

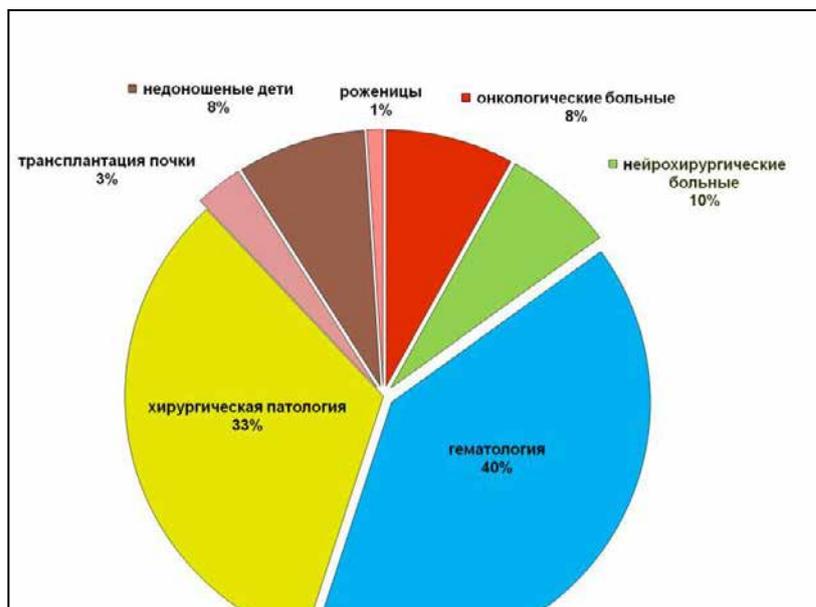


Рисунок 15 – Структура потребности КТК в ЛПУ Тюменской области

После трансфузии КТК больным ГС скорректирован, а посттрансфузионных осложнений не выявлено во всех клиниках. При этом СПТ составил: через 1 час  $8,5 \pm 3,5 \times 10^9 / \text{л}$  и через 24 часа  $10,2 \pm 3,5 \times 10^9 / \text{л}$  (ЛПУ, Владимир);  $8,0 \pm 2,0 \times 10^9 / \text{л}$  и  $9,6 \pm 1,7 \times 10^9 / \text{л}$  соответственно (ЛПУ, Тюмень).

Ниже представлены примеры по использованию КТК в клинической практике ЛПУ, Владимир.

### Пример 1.

Женщина, 54 года. Диагноз: Тяжелая сочетанная травма, закрытая черепно-мозговая травма, ушиб головного мозга. Перелом костей таза, перелом костей левого предплечья, перелом костей правой голени. Кровопотеря более 2000 мл. А(II), Резус-отрицательный. Площадь поверхности тела  $1,9 \text{ м}^2$  Тромбоцитопения концентрация тромбоцитов  $15 \times 10^9 / \text{л}$ . Лечение. Заявка на ТК поступила вечером в субботу. Через 2,5 часа от подачи заявки на ТК начата трансфузия КТК А(II), Резус-отрицательный (3 дозы, количество тромбоцитов  $3,9 \times 10^{11}$ ).

Эффективность. Переносимость хорошая. Через 1 час после окончания трансфузии КТК концентрация тромбоцитов в крови больного  $14 \times 10^9 / \text{л}$ , через 10

часов  $28 \times 10^9/\text{л}$  (СПТ  $6,9 \times 10^9$ ), через сутки  $23 \times 10^9/\text{л}$  (СПТ  $5,0 \times 10^9$ ). Клинических проявлений ГС нет.

### **Пример 2.**

Женщина, 29 лет. Диагноз: нарушение менструальной функции по типу менометроррагии в репродуктивном периоде. Тромбоцитопения. Анемия. СКВ. Кровопотеря более 1000 мл. А (II), Резус-отрицательный, Площадь поверхности тела  $1,86 \text{ м}^2$ . Тромбоцитопения количество тромбоцитов  $17 \times 10^9/\text{л}$  – противопоказание для хирургического гемостаза. Лечение Заявка на ТК поступила в субботу. В субботу перелито 4 дозы КТК (количество тромбоцитов  $5,9 \times 10^{11}$ ). Эффективность. После окончания трансфузии КТК концентрация тромбоцитов в крови  $9 \times 10^9/\text{л}$  и темп кровотечения значительно сократился до сукровичного отделяемого. В воскресенье перелито 3 дозы КТК (количество тромбоцитов  $4,3 \times 10^{11}$ ). Кровотечение остановлено. Концентрация тромбоцитов в крови больной через 1 час после окончания трансфузии КТК –  $43 \times 10^9$ , через 10 часов –  $37 \times 10^9$  (СПТ,  $14,3 \times 10^9$  и  $11,7 \times 10^9$ , соответственно). Операцию отменили. Кровотечение остановлено консервативно.

### **Пример 3.**

Мужчина, 40 лет. Диагноз: Апластическая анемия. Профузное носовое кровотечение. Кровопотеря более 500 мл. В (III) резус-отрицательный. Тромбоцитопения – концентрация тромбоцитов –  $1 \times 10^9$ . Лечение Трансфузии КТК 3, 4, 5 марта (11 доз за 3 дня). Эффективность. Кровотечение остановлено. Концентрация тромбоцитов в крови после трансфузий  $27 \times 10^9/\text{л}$ . Профилактически с марта по ноябрь 2018 г. больному перелито 20 доз КТК + 80 доз ТК (посттрансфузионных реакций и осложнений нет).

Внедрение технологии КК тромбоцитов в ГБУЗ ВО ОСПК и ГБУЗ ТО ОСПК позволило: отказаться от списания ТК по сроку годности, карантинизировать КТК и не использовать технологию инактивации патогенов в ТК, создать стратегический запас тромбоцитных компонентов для планового и экстренного использования, обеспечить индивидуальный подбор КТК больным и получить положительный клинический эффект при лечении больных с ГС.

## **5.6 Влияние индивидуальной совместимости тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов с реципиентами на их клиническую эффективность**

Несмотря на высокую клиническую эффективность ТК и КТК (более 90% трансфузий) выявлены больные, у которых не наблюдали значимого изменения СПТ после трансфузии ТК и КТК. Дополнительное обследование этой категории больных показало, что у них выявлены АТА. В связи с этим проводили индивидуальный подбор ТК и КТК для оценки влияния иммунизации реципиентов с хирургической патологией на эффективность трансфузии ТК и КТК.

Индивидуальная совместимость ТК и КТК с сывороткой реципиентов также наблюдалась не у всех больных. Большинству больных – 75 (78%) – проведены индивидуально совместимые трансфузии ТК и КТК.

Терапевтический эффект (снижение интенсивности или темпа кровотечения, отсутствие новых петехий или кровоподтеков на коже и слизистых, остановка носового кровотечения и кровотечения со слизистых, а также язв желудка и кишечника и т.д.) после трансфузии как ТК, так и КТК, был достигнут не у всех пациентов, вероятно из-за особенностей клинического состояния больных. После окончания трансфузии ТК и КТК больным не выявлено посттрансфузионных реакций.

Для определения влияния аллоиммунизации реципиентов и совместимости с ТК и КТК на их клиническую эффективность больных разделили на группы. Наиболее значительную группу составили реципиенты, не имеющие АТА и совместимые с КТК ( $n=65$ ).

После трансфузии КТК пациентам определяли СПТ через 1 и 24 часа, а также СП ФАТ через 1 и 24 часа после окончания трансфузии. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Влияние иммунологической совместимости на эффективность КТК по СПТ и СП ФАТ в крови больных

Иммунологические особенности больных и совместимость КТК	СПТ, $\times 10^9/\text{л}$		СП ФАТ, $\times 10^9/\text{л}$	
	через 1 час	через 24 часа	через 1 час	через 24 часа
АТА выявлены, совместимы с КТК по НРА и HLA ( $n=10$ )	8,1	19	27	25
АТА выявлены, несовместимы с КТК по НРА и HLA ( $n=12$ )	6	8,5	11	10
АТА не выявлены, совместимы с КТК по НРА и HLA ( $n=65$ )	5,9	9,4	11	21
АТА не выявлены, несовместимы с КТК по НРА и HLA ( $n=9$ )	1,4	6,1	7	12

Значимое отличие и наибольший СПТ и СП ФАТ определялся через 24 часа как у больных с АТА, так и без АТА, совместимых с КТК ( $U_{\text{эмп}} < U_{\text{кр}}$ ). Таким больным одной трансфузии, совместимых с реципиентами КТК, было достаточно для остановки кровотечения, по сравнению с трансфузией несовместимых КТК, которое потребовало повторное переливание.

После переливания КТК повторные трансфузии тромбоцитных компонентов практически не требовались больным ранее получившим трансфузии совместимых КТК. Напротив, у больных, получившим несовместимую трансфузию КТК, сохранялась потребность в повторной трансфузии (в среднем одна доза ТК). У больных, получивших совместимую трансфузию КТК, также в 1,5 раза меньше требовалось повторных трансфузий ЭСК (в среднем 2,6 дозы) и в 3 раза меньше свежемороженой плазмы (в среднем 2,8 дозы, или 800 мл), чем у больных после несовместимой трансфузии КТК - ЭСК (в среднем 3,8 дозы) и свежемороженой плазмы (в среднем 8,3 дозы или 2500 мл).

При трансфузии ТК, по совместимости тромбоцитов и наличию АТА, было сформировано три группы. После трансфузии ТК больным определяли СПТ ( $\times 10^9/\text{л}$ ) через 1 и 24 часа, а также СП ФАТ ( $\times 10^9/\text{л}$ ) через 1 и 24 часа (Таблица 12).

Таблица 12 – Влияние иммунологической совместимости на эффективность ТК по СПТ и СП ФАТ в крови больных

Иммунологические особенности больных и совместимость ТК	СПТ, $\times 10^9/\text{л}$		СП ФАТ, $\times 10^9/\text{л}$	
	Через 1 час	Через 24 часа	Через 1 час	Через 24 часа
АТА выявлены, совместимы с ТК по НРА и HLA ( $n=12$ )	28,9	11	14	23
АТА не выявлены, совместимы с ТК по НРА и HLA ( $n=14$ )	28	5,5	37	59
АТА выявлены, несовместимы с ТК по НРА и HLA ( $n=10$ )	1,2	0	12	0,99

Наблюдала значимое отличие и наибольший СПТ и СП ФАТ, как после трансфузии ТК, также и после трансфузии КТК, который сохранялся через 24 часа у больных без АТА, совместимых с ТК ( $U_{\text{эмп}} < U_{\text{кр}}$ ). Таким больным одной трансфузии совместимых ТК было достаточно для остановки кровотечения, по сравнению с трансфузией несовместимых КТ, после которого требовалось повторное переливания.

После окончания трансфузии КТК повторные трансфузии тромбоцитных компонентов практически не требовались больным, ранее получившим трансфузию совместимых ТК. Напротив, у больного, получившего несовместимую трансфузию ТК, сохранялась потребность в повторных трансфузиях трех доз ТК. У больных, получивших совместимую трансфузию ТК, потребность в повторных трансфузиях ЭСК (в среднем 2,4 дозы) и в плазмы (в

среднем 3,3 дозы) была сопоставима с группой больных, также получивших совместимую трансфузию КТК.

Стоимость гемотрансфузионной терапии складывалась из себестоимости ТК и КТК перелитых с учетом совместимости, а также стоимости гемокомпонентов перелитых после.

Себестоимость одной дозы ТК, полученного методом афереза, в клиниках РФ по состоянию на 2015 году составляет 12186 руб. [13]. Одна лечебная доза тромбоцитов, размороженных или КТК стоит дороже - 13591 руб. Себестоимость свежзамороженной плазмы составляет в среднем 5587 руб./доза, а эритроцитного компонента – 4611 руб./доза.

Стоимость расходных материалов для скрининга АГА и проведения теста на индивидуальную совместимость составляет 94 Евро или 7000 руб. (по курсу ЦБ РФ 74,8 руб. за 1 Евро в 04.08.2016 г.). Этот набор рассчитан для анализа 6 образцов. Таким образом, себестоимость одного анализа не превышает 1200 руб.

Исходя из того, что формула расчета стоимости гемотрансфузионной терапии после совместимой трансфузии включала также и стоимость исследования на совместимость, а несовместимой трансфузии не включала рассчитали итоговую стоимость гемокомпонентной терапии (таблица 13).

Таблица 13 – Стоимость гемокомпонентной терапии больных первой и второй исследуемых групп после трансфузии индивидуально подбираемых ТК и КТК

Иммунологические особенности больных и совместимость ТК и КТК	Стоимость гемокомпонентов, руб.			Стоимость анализа на совместимость, руб.	Итого, руб.
	тромбоцитные	эритроцитные	плазма		
АТА есть, совместимы с КТК	9514/ 0,7	11066/ 2,4	16761/ 3,0	1200	38541
АТА есть, несовместимы с КТК	10193/ 0,75	6917/ 1,5	25700/ 4,6		42810
АТА нет, совместимы с КТК	9514/ 0,7	12910/ 2,8	14526/ 2,6	1200	38150
АТА нет, несовместимы с КТК	20387/ 1,5	28127/ 6,1	67044/ 12		115558
АТА есть, совместимы с ТК	6093/ 0,5	11527/ 2,5	15085/ 2,7	1200	33905
АТА нет, совместимы с ТК	8530/ 0,7	10605/ 2,3	22348/ 4	1200	42683
АТА есть, несовместимы с ТК	36558/ 3	9222/ 2	16761/ 3		62541

Анализ стоимости гемокомпонентной терапии показал, что ее себестоимость для больных, получивших совместимую трансфузию ТК и КТ, в среднем составляет 38320 руб., что в 2 раза меньше по сравнению со стоимостью 73636 руб. для больных, ранее получивших несовместимую трансфузию ТК или КТК.

Проведенные исследования показали, что производство ТК, с использованием современных аппаратных аферезных технологий позволяет получить

гемокомпоненты высокого качества с высокой клинической эффективностью. Тромбоцитаферез значимо не влияет на гематологические показатели крови донора и является безопасной процедурой. Для оценки эффективности трансфузий ТК следует оценивать не только количество тромбоцитов и клиническое состояние больного, но и изменения ФАТ в крови пациента после трансфузии ТК. Определение СПТ через 1 час и 24 часа после окончания трансфузии ТК является надежным методом определения эффективности трансфузии. Однако дополнительная оценка СПТ ФАТ позволяет оценить не только эффективность, но и определить дальнейшую потребность в ТК. Технология КК тромбоцитов гарантирует производство безопасных клеточных компонентов крови надлежащего качества с высокой клинической эффективностью и безопасностью при трансфузии. Все процедуры проходят в закрытом стерильном контуре, что позволяет исключить контаминацию компонентов крови. Замораживание и длительное хранение тромбоцитов позволило проводить карантинизацию КТК, выбраковать гемокомпоненты, задержанные по Гепатиту В, С, ВИЧ и др., что снизило риск передачи гемотрансмиссивных инфекций реципиентам.

В результате исследования показана высокая клиническая эффективность ТК и КТК с целью коррекции ГС, обусловленного выраженной тромбоцитопенией. Исходя из полученных данных, следует, что КТК, заготовленные по разработанной в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» методике, а также в ГБУЗ ВО ОСПК (г. Владимир) и ГБУЗ ТО ОСПК (г. Тюмень), по совокупности клинических критериев более перспективны для клинического использования по сравнению с ТК. Наличие банка КТК позволило продлить срок хранения ТК с 5 суток до 24 месяцев и обеспечить достаточное количество КТК для индивидуального подбора не только по системе АВ0 и Резус-фактору, но и по НЛА и НРА. Подбор ТК и КТК с учетом индивидуальной совместимости с реципиентами повысил эффективность гемокомпонентной терапии и продлил время циркуляции донорских тромбоцитов в крови реципиентов. Внедрение индивидуального подбора КТК и ТК для реципиентов в ГБУЗ «НИИ Скорой

помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» также позволило сократить не только интенсивность, но и стоимость трансфузионной терапии, что делает такой подход не только клинически эффективным, но и экономически целесообразным.

Внедрение технологии производства КТК в отделении производственной и клинической трансфузиологии, гравитационной хирургии крови ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» позволило создать достаточные стратегические запасы карантинизированных КТК круглосуточно, доступных для трансфузии больным, а также:

- управлять запасами ТК (сроки хранения, антигенное разнообразие);
- регулировать потоки доноров;
- карантинизировать тромбоциты, что исключает риск трансмиссии инфекции и достойная альтернатива инактивации патогенов;
- индивидуально подбирать тромбоцитные компоненты, исключая иммунологическую несовместимость (исключает рефрактерность и сокращает трансфузии).

Разработанная и внедренная технология КК позволила регулировать запасы ТК и поддерживать их высокое качество путем перевода их в режим длительного хранения, что исключило списание ТК по сроку годности.

## Глава 6. Обсуждение

Проведение исследования продиктовано необходимостью разработки автоматизированной технологии КК тромбоцитов и внедрением ее в клиническую практику.

Исследования, проведенные в трансфузиологии, клинической лабораторной диагностике, криобиологии и биохимии продемонстрировали тенденцию неоднородности доноров тромбоцитов, которая обусловлена большим количеством факторов, не связанных с иммунологическими параметрами. [5, 12, 16, 38, 166, 169]. Большое разнообразие факторов, по которым можно классифицировать тромбоциты доноров, затрудняет подбор критериев «идеального донора» тромбоцитов. В настоящее время Служба Крови РФ заинтересована в увеличении числа доноров, особенно среди молодежи [32]. Вместе с тем, не все здоровые люди могут быть донорами тромбоцитных компонентов. Потенциал донора ТК напрямую зависит от содержания в его крови ФАТ. Доноры с высоким содержанием ФАТ более предпочтительны для заготовки ТК, особенно при использовании дорогостоящего аппаратного афереза [54]. Наибольшие значения ФАТ отмечены в крови доноров женского пола до 29 лет. К тому же, при одинаково высоком значении ФАТ (70-75%) в ТК доноров-мужчин и доноров-женщин в возрасте до 29 лет тромбоциты, полученные у женщин, менее чувствительны к низким дозам АДФ. Следовательно, ТК доноров-женщин имеют меньшие риски спонтанной активации тромбоцитов при хранении. Считается, что тромбоциты молодых доноров обладают значительно большим репаративным потенциалом, чем тромбоциты пожилых – например, при лечении обогащенной тромбоцитами плазмы дефектов костной и хрящевой ткани [103, 138, 164] – однако явного влияния возраста донора на качество его тромбоцитов выявить авторам не удалось. Напротив, у доноров-мужчин наблюдали похожие значения ФАТ во всех возрастных группах, у доноров-женщин значения ФАТ были близкими в группах от 20 до 39 лет и лишь в группе

40-49 лет наблюдали явное снижение этих параметров. Более низкое качество тромбоцитов у женщин в возрасте от 40 до 49 лет, вероятно, обусловлено изменением гормонального фона, вызванного менопаузой, в частности, колебанием концентрации эстрогенов, которые оказывают значительное влияние на мегакариоцитарный росток костного мозга, и, следовательно, на образование тромбоцитов [131, 169]. В целом, доноры-женщины имеют в среднем более высокое содержание тромбоцитов с гранулами как в крови, так и в ТК, при этом тромбоциты доноров-женщин также более устойчивы к КК. Сохранность ФАТ при КК тромбоцитов напрямую не зависит не только от пола и возраста донора, но даже от исходного уровня ФАТ. Так, неоднократно отмечено, что сохранность биологически полноценных тромбоцитов в ТК с ФАТ=70-75% после КК может быть меньше, чем в ТК с ФАТ=35-42%. К настоящему моменту нет оснований полагать, что тромбоциты доноров с ФАТ=35-42% имеют более низкую клиническую эффективность, тем более что при большом числе патологий содержание ФАТ в циркулирующей крови значительно ниже 35%, а при выраженных кровотечениях не превышает 9-10% [26]; вместе с тем, более низкое значение ФАТ может негативно влиять на сохранность тромбоцитов в ТК в процессе их хранения. Наличие среди доноров субпопуляции с невысоким содержанием ФАТ может быть отчасти связано с гормональным статусом – в мужской популяции значение ФАТ=35-42% встречается гораздо чаще, чем в женской; хотя, нельзя исключать роли более тонких различий на уровне генотипа. Лица с ФАТ=35-42% часто выявляются, в том числе, среди кадровых доноров, однако, повторные донации значимо не влияют на качество тромбоцитов у доноров-мужчин, а у доноров-женщин снижение количества ФАТ в крови наблюдали лишь в тех случаях, когда промежуток между донациями не превышает 2,5 недель. Следовательно, донорам-женщинам стоит избегать очень частых донаций тромбоцитов. Таким образом, при заготовке ТК отбор «идеальных» доноров должен носить дифференцированный характер. Не исключено, что тромбоциты одного и того же донора могут оказаться эффективными, так и неэффективными в процессе использования. Следовательно,

определение параметров «идеального» донора ТК должно быть неразрывно связано с поставленными клиническими задачами. Исходя из результатов исследования, для получения ТК высокого качества методом тромбоцитафереза следует допускать активных кадровых доноров: мужчин в возрасте от 31 до 40 лет с концентрацией тромбоцитов в крови – не менее  $250 \times 10^9/\text{л}$  и ФАТ – не менее 50%; женщин в возрасте от 31 до 40 лет с концентрацией тромбоцитов в крови – не менее  $260 \times 10^9/\text{л}$  и ФАТ – не менее 60%.

Проведенная оценка состояния тромбоцитов у доноров и больных, а также в ТК с использованием количественных и качественных методов анализа показала, что состояние тромбоцитов отличаются как в крови доноров ТК и больных, так в ТК. Однако более выраженные изменения состояния тромбоцитов выявлены с использованием качественных методов оценки тромбоцитов. В работе использованы такие качественные показатели маркеров тромбоцитов для оценки ФАТ:

- фосфатидилсеринположительные тромбоциты;
- PAC-1 положительные тромбоциты;
- CD62-положительные тромбоциты.

Эти показатели являются чувствительными и специфичными для характеристики ФАТ. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность, эти показатели относительны. Относительная величина ФАТ не может достаточно полно отражать качество гемокомпонента. Также относительные значения ФАТ не позволяют оценить степень тромбоцитопении у больных.

В связи с этим требуется перевод относительных значений ФАТ в абсолютные значения. Из использованных качественных показателей наиболее специфичным является – адгезивная активность тромбоцитов – которая отражает как структурную целостность, так и функциональную активность тромбоцитов. Морфометрический метод для оценки ФАТ прост в применении, не требует больших трудозатрат и времени у медперсонала.

Объединение количественных и качественных показателей состояния тромбоцитов позволяет получить абсолютные значения ФАТ, которые пригодны как для оценки качества ТК, так и характеристики тромбоцитопении у больных.

В результате объединения количественных и качественных показателей получено два интегральных показателя ФАТ:

1. Количество ФАТ,  $\times 10^9$  в дозе – интегральный параметр ФАТ объединяет общее количество тромбоцитов и долю ФАТ.

2. Концентрация ФАТ,  $\times 10^9/\%$  - интегральный параметр ФАТ объединяет концентрацию тромбоцитов и долю ФАТ.

Оба интегральных показателя включают как количественные, так и качественные параметры. Значения как количественных, так и качественных показателей в норме и патологии известны. В норме концентрация тромбоцитов в крови как у мужчин, так и женщин составляет  $180-320 \times 10^9/\text{л}$  [34]. Количество тромбоцитов в ТК из дозы крови должно быть не менее  $60 \times 10^9$  (эквивалент одной дозы крови), а в ТК, полученных методом афереза – не менее  $200 \times 10^9$  в дозе [29].

Качественные показатели тоже установлены. В крови здоровых людей ФАТ составляет 30-75% [26]. В проведенных исследованиях показано, что процедура тромбоцитафереза значимо не влияет на содержание ФАТ в ТК. В связи с этим концентрация ФАТ в ТК аналогична крови доноров ТК и составляет 30-75%.

Зная, как количественные, так и качественные показатели нормы рассчитаны значения нормы для интегральных показателей.

Первый интегральный параметр ФАТ – Количество ФАТ,  $\times 10^9$  в дозе – предназначен для оценки качества ТК.

Значение количества ФАТ для ТК из дозы крови, рассчитано по формуле:

Количество тромбоцитов  $60 \times 10^9 \times \text{ФАТ (30-70\%)} / 100$ , что составляет  $18-40 \times 10^9$  в дозе.

Значение количества ФАТ для ТК, полученных методом афереза, рассчитано по формуле:

Количество тромбоцитов  $200 \times 10^9 \times \text{ФАТ (30-70\%)} / 100$ , что составляет  $60-140 \times 10^9$  в дозе.

Второй интегральный параметр ФАТ - Концентрация ФАТ,  $\times 10^9/$  - предназначен для оценки тромбоцитопении у больных.

Значение концентрации ФАТ в крови, рассчитано по формуле:

Концентрация тромбоцитов  $180-320 \times 10^9/л$  x ФАТ (30-70%)/ 100, что составляет  $54-224 \times 10^9/л$ .

В результате расчетов получены референсные значения для трех интегральных показателей:

1. Количество ФАТ для ТК из дозы крови –  $18-40 \times 10^9$  в дозе.
2. Количество ФАТ для ТК, полученных методом афереза –  $60-140 \times 10^9$  в дозе.
3. Концентрация ФАТ в крови –  $54-224 \times 10^9/л$ .

Таким образом, на основании выявленных отличий ФАТ как в крови доноров и больных, так и в ТК на разных сроках хранения, определены новые референсные интегральные параметры ФАТ. Разработанный первый интегральный показатель – количество ФАТ – будет использован для анализа качества КТК и ТК при их сравнении. Рассчитаны референсные значения этого показателя для ТК из дозы крови –  $18-40 \times 10^9$  в дозе и для ТК, полученных методом афереза –  $60-140 \times 10^9$  в дозе. Определенные референсные значения этого показателя позволят вывить отклонения в качестве ТК и КТК. Разработанный второй интегральный показатель – концентрация ФАТ – будет использован для решения нескольких задач. Во-первых, для оценки тромбоцитопении у доноров ТК и больных. Во-вторых, для оценки эффективности трансфузии КТК и ТК по СП ФАТ в крови больных. Рассчитанные значения нормы концентрации ФАТ в крови –  $54-224 \times 10^9/л$  – позволят вывить тяжесть тромбоцитопении и ее изменения после трансфузии ТК и КТК.

Перед тромбоцитаферезом у доноров ТК определяли показатели ФАТ и затем сравнивали с значением ФАТ в ТК, полученных от этих доноров. По литературным данным у здоровых доноров содержание ФАТ в крови варьировало от 30 до 70% [24, 26, 37, 46]. Показано, что содержание ФАТ в ТК было идентично содержанию ФАТ в крови доноров до тромбоцитафереза и составило  $47,4 \pm 3,7\%$ . Качество всех заготовленных нами ТК соответствовало требованиям

технического регламента [29]. Объем ТК составил 200 мл, рН  $7,2\pm 0,2$ , а содержание тромбоцитов и ФАТ в ТК –  $218\pm 14,5\times 10^9$ /дозе и  $112,4\pm 16,9\times 10^9$ /дозе, соответственно. При этом в процессе хранения ТК при температуре от 20 до 24<sup>0</sup>С и постоянном перемешивании абсолютное содержание тромбоцитов и рН значимо не изменялось в течение 5 суток хранения.

Содержание ФАТ в ТК только в 1-е и 2-е сутки хранения значимо не менялось и оставалось высоким:  $101\pm 20,5\times 10^9$ /дозе и  $97,4\pm 16,7\times 10^9$ /дозе соответственно, что подтверждают ранее полученные данные [7]. Через 3 и 5 дней хранения наблюдалось десятикратное резкое снижение (в 10 раз) содержания ФАТ в ТК до  $32,3\pm 7,3\times 10^9$ /дозе и  $9,5\pm 4,8\times 10^9$ /дозе, соответственно.

Разработка и внедрение в практику методов длительного хранения тромбоцитов – КК – позволяет решать ряд актуальных задач производственной трансфузиологии: проведение карантинизации ТК и обеспечение безопасности трансфузии; создание стабильного запаса ТК, независимого от донорской активности. До сих пор КК тромбоцитов не было широко внедрено в клиническую практику. В мировой практике для длительного хранения ТК наиболее часто используют подходы, разработанные R.Valeri с соавт. [170]. Однако данная технология не автоматизирована, не содержит специальных устройств для криоконсервации тромбоцитов. Кроме того, используемые в этой технологии медицинские изделия и расходные материалы не разрешены для медицинского использования на территории РФ, что ограничивает использование КТК как в гражданской, так и в военной медицине. Тромбоциты человека обладают уникальным строением и функцией, что создает ряд особенностей, связанных с оценкой их качества, хранением и использованием в клинической практике. В клинической лабораторной диагностике и производственной трансфузиологии не предложены адекватные методы оценки качества тромбоцитов до и после КК. Во многом это связано с тем, что в работе исследователей отсутствовал морфофункциональный анализ тромбоцитов. Широко распространенный метод агрегометрии не позволяет оценить точное содержание биологически полноценных клеток в пробе, его использование

невозможно при работе с тромбоцитами в бесплазменной среде. Более того, присутствие в плазме дополнительных агентов – КП – значительно затрудняет интерпретацию полученных данных. В связи с этим особую значимость представляет использование морфофункциональных методов оценки тромбоцитов, которые позволяют параллельно оценить и структурную полноценность тромбоцитов, и их функциональную активность. Достичь этого можно лишь при исследовании нефиксированных клеток. Поэтому способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью прижизненного окрашивания оказался чрезвычайно важным для разработки метода КК.

При работе с витально окрашенными тромбоцитами появилась возможность динамической оценки качества этих клеток при их контакте с ДМСО. Тромбоциты человека имеют очень сложную, легко повреждаемую структуру и могут спонтанно активироваться. В работах Макарова М.С. показано, что ДМСО обладает двойным действием: с одной стороны, вызывает явные повреждения тромбоцитарных мембран, с другой – ДМСО способен стимулировать активацию тромбоцитов *in vitro* [26]. Все это указывает на необходимость минимизации контакта тромбоцитов с ДМСО в процессе их подготовки к криохраниению. С другой стороны, успех КК во многом зависит от качества клеток исходных ТК. Анализ большой выборки доноров и их ТК выявил высокую неоднородность по уровню ФАТ как у мужчин, так и у женщин. В среднем, в крови и ТК женщин доноров наблюдали более высокое качество тромбоцитов. С другой стороны, во всех гендерно-возрастных группах можно было выявить лиц с невысоким количеством ФАТ (35-40%), а также лиц с ФАТ, близким к верхнему пределу нормы (75%). Последние являются наиболее предпочтительными для заготовки ТК – как для КК, так и для хранения при температуре от +20 до +24<sup>0</sup>С и непрерывном помешивании. Однако, число доноров с уровнем ФАТ выше 70% обычно не превышает 5-10%. Напротив, доноры с 35-40% ФАТ встречаются довольно часто (20-25% случаев). В процессе хранения ТК при комнатной температуре содержание ФАТ заметно не снижается в течение 2 суток, но при более длительном хранении наблюдается заметное падение доли ФАТ, при том,

что общее содержание тромбоцитов в ТК практически не меняется даже после 5 суток. Учреждениям Службы Крови можно предложить следующую тактику: первичный мониторинг всех доноров и их ТК на предмет оценки качества клеток, отбор ТК с наиболее высоким уровнем ФАТ для короткого хранения, отбор ТК, наиболее пригодных к КК, и минимизация сроков короткого хранения.

Для получения КТК заготавливали ТК только методом афереза на сепараторе крови Trima Accel®, что позволяло получать лечебные дозы для взрослых только от одного донора. Это очень важно, так как в последующем КТК карантинизировали. Тромбоциты КК по оригинальной методике, разработанной в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», с использованием разрешенного в РФ – КП CryoSure Dex40. В результате проведенной работы показано, что качество РТ отвечает отечественным и зарубежным стандартам [29, 41].

Для определения содержания ФАТ в КТК использована методика оценки морфофункционального статуса тромбоцитов. Использование морфологических критериев оценки функциональной пригодности тромбоцитов обоснованно и подтверждается данными литературы. Мазуров А.В. утверждает, что биологическая активность и функциональная полноценность тромбоцитов напрямую зависит от их морфологической целостности, поэтому наиболее достоверными методами оценки качества тромбоцитов считаются морфометрические и цито-морфометрические методы [23]. Наши исследования показали, что после размораживания объем КТК не изменился и составил 200 мл. Также значимо не изменилось и значение рН, которое составило  $7,0 \pm 0,2$  (исходное значение  $pH=7,2 \pm 0,1$ ). Осмолярность незначительно превысила физиологические показатели -  $380 \pm 6,7$  мОсмоль/л. Количество тромбоцитов снизилось до  $180 \pm 10 \times 10^9$ /дозе ( $68 \pm 4,1\%$  от исходного). Содержание ФАТ снизилось до  $78,5 \pm 6,2 \times 10^9$ /дозе ( $52 \pm 3,6\%$  от исходного).

В работе уделено особое внимание токсическому воздействию ДМСО на тромбоциты при их криоконсервировании. При КК ТК особое внимание уделено токсичности ДМСО. Концентрация ДМСО в КТК ( $0,4 \pm 0,1\%$ ) после размораживания была нетоксична и не требовала удаления КП.

Гиперосмолярность КП на основе ДМСО, которая достигает 1200 мОсмоль/л при концентрации ДМСО 5%, значительно снижает качество тромбоцитов. В отличие от эритроцитов, которые выдерживают осмолярность порядка 1500 мОсмоль, тромбоциты теряют до 50% функциональных свойств при осмолярности 800 мОсмоль/л [122, 123]. Низкая концентрация ДМСО в РТ, достигнутая дилуцией тромбоцитов плазмой, позволила сохранить ФАТ в РТ. Слабая токсичность низких концентраций ДМСО подтверждена исследованиями, проведенными Lars Asmis с соавт. [97]. Они показали, что после инкубирования тромбоцитов с 0,5% раствором ДМСО в течение 30 минут агрегационная активность тромбоцитов не менялась при действии агонистов АДФ ( $10^{-5}$ , 1,25 мкМ), коллаген ( $10^{-5}$ , 1,25 мг/мл), эпинефрин ( $10^{-5}$ , 1,25 мкМ) и ристоцетин (1,25; 0,62 мг/мл) [96]. При этом, авторы отмечали снижение циклооксигеназной активности на 36% по сравнению с контролем, что можно компенсировать введением экзогенного тромбоксана А2. Учитывая хорошую переносимость трансфузий гемопоэтических стволовых клеток, содержащих ДМСО 1,6% (20,0 ммоль/л), оптимальная концентрация ДМСО 0,7%, получаемая после дилуции ТК плазмой, является релевантной [129]. В работе Samici G.G с соавторами, даже большая концентрация ДМСО 1% - нетоксична для эндотелиальных клеток человека, гладкомышечных клеток и моноцитов крови [95].

Разработанная методика КК тромбоцитов позволила сохранить в среднем 51-53% от всего числа ФАТ в исходной дозе. Среди обследованных доз ТК в 45% случаев сохранность ФАТ после КК составляла 51%-60%, в 20% случаев – 60-80%, в 25% - от 30 до 50%. Стоит отметить, что общая сохранность ФАТ могла быть менее 50% как при высокой (35-40%), так и при высокой (70-75%) концентрации ФАТ в исходных ТК. Можно сказать, что этот показатель сохранности ФАТ в 51-53% не является предельным и стоит далее оптимизировать методику, для достижения более высокой сохранности. С другой стороны, предложенный способ КК тромбоцитов дает более высокий процент сохранности ФАТ по сравнению с другими известными методами. Это во многом связано с тем, что при контакте тромбоцитов с ДМСО до КК минимизируется

время подготовки пробы к криохраниению, а после КК – происходит дилуция доз плазмой, в результате чего концентрация ДМСО снижается с 5-6% до 0,5%. В методике, предложенной R.Valeri, дилуция ДМСО отсутствует, что в конечном итоге также влияет на качество ТК и их трансфузий. Концентрация 5-6% ДМСО представляется адекватной; однако использование ДМСО без других протекторов не позволяет сохранить наружные структуры тромбоцитов, ассоциированные главным образом с их мембранами. Неоднократно показано, что целостность тромбоцитарных мембран играет критическую роль для биологической полноценности тромбоцита. Комбинация ДМСО и декстрана позволяет осуществлять комплексную защиту тромбоцитарных структур в процессе КК. Разработанный нами способ КК тромбоцитов включает очередность действий с минимальным влиянием на тромбоциты на всех этапах технологического процесса. Из процессинга исключены перекрестные влияния двух и более травмирующих тромбоциты технологических факторов: гравитация, осмотический и температурный шок. Нужно признать, что значительная часть тромбоцитов с гранулами имеет очень низкую устойчивость к ДМСО и начинает повреждаться уже через 10-15 мин в присутствии концентраций 5-6%. Однако даже снижение концентрации ДМСО до 1-1,5% не позволяет значительно пролонгировать жизнеспособность тромбоцитов. Ранее L. Asmis с соавт показали, что растворы 0,5-0,6% ДМСО обладают низкой токсичностью по отношению к тромбоцитам человека. По их данным, после инкубирования тромбоцитов с 0,5% ДМСО в течение 30 минут агрегационная активность тромбоцитов не менялась при действии агонистов АДФ ( $10^{-5}$ , 1,25мкМ), коллаген ( $10^{-5}$ , 1,25 мг/мл), эпинефрин ( $10^{-5}$ , 1,25мкМ) и ристоцетин (1,25; 0,62 мг/мл) [96]. Настоящее исследование показало, что в условиях 0,5% ДМСО тромбоциты человека сохраняют свою структурную и функциональную полноценность в течение 4 часов. Следовательно, хранение РТ, приготовленных по нашей методике, не должно значительно превышать этого срока. При трансфузиях ТК с 0,5% ДМСО неблагоприятные побочные действия во всех случаях отсутствовали. Таким образом, КТК можно считать практически безопасными.

Предложенный нами способ анализа витально окрашенных тромбоцитов представляется очень ценным как для научно-исследовательских, так и для прямых практических целей. В частности, подсчет числа ФАТ позволит точно определить общий функциональный и клинический потенциал дозы ТК. По нашим данным, наиболее эффективными являются дозы, содержащие не менее  $80 \times 10^9$  ФАТ. При трансфузии таких доз коррекция ГС наступала более чем в 90% случаев. С учетом того, что одна стандартная доза ТК может содержать до  $200 \times 10^9$  тромбоцитов, возникает возможность более эффективного использования всего объема ТК, и, следовательно, заметного сокращения общего объема трансфузий. Предотвращение избыточных переливаний доз ТК представляется весьма актуальным как с экономической, так и с клинической точки зрения.

Большую проблему представляет оценка эффективности производимых трансфузий. В настоящее время общепринятым является параметр СПТ, однако, как показало наше исследование, значение СПТ может слабо коррелировать с клинической эффективностью перелитого ТК. Неоднократно показано, что после трансфузий ТК 3-х и 4-х суток хранения значения СПТ соответствуют норме, однако коррекция ГС не происходит. С другой стороны, остановка кровотечений всегда сопровождалось заметным увеличением уровня ФАТ в крови пациента. В отдельных случаях эффективная трансфузия ТК повышала долю ФАТ в 5-10 раз (с 1-5% до 10-30%). Таким образом, для анализа эффективности трансфузий более ценным представляется мониторинг концентрации тромбоцитов с гранулами в крови, а также степень их адгезивной активности. Мы неоднократно говорили, что структурно полноценные тромбоциты с гранулами могут не проявлять функциональной активности, иногда – это является очень выраженным. Поэтому мониторинг ФАТ имеет принципиальное значение при оценке эффективности трансфузий ТК. Мы считаем, что мониторинг ФАТ позволит оптимизировать не только трансфузионную тактику, но и улучшить всю проводимую терапию в целом.

Трансфузию ТК и КТК проводили больным с выраженной тромбоцитопенией (концентрация тромбоцитов в крови больных в среднем составляла  $60 \times 10^9/\text{л}$ ) и ГС

(геморрагическое отделяемое по дренажам, петехиальная сыпь, постинъекционные кровоподтеки на коже), находящихся на лечении в хирургических и реанимационных отделениях ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». Наиболее востребованы были ТК и КТК для лечения кардиохирургических, нейрохирургических больных и пациентов с сочетанной травмой. Интенсивно переливали ТК и КТК больным после трансплантации легких, печени и сердца. Трансфузии ТК проводили на разных сроках хранения, а КТК сразу после размораживания. Все больные получили лечебные дозы ТК разных сроков хранения, но с равным содержанием тромбоцитов: 1-и сутки хранения –  $260 \pm 30 \times 10^9$ /дозе; 2-е суток –  $210 \pm 30 \times 10^9$ /дозе; 3-е суток –  $220 \pm 40 \times 10^9$ /дозе; 4-е суток –  $210 \pm 30 \times 10^9$ /дозе, а также КТК –  $250 \pm 30 \times 10^9$ /дозе. Антропометрические данные больных, получивших ТК, не отличались от пациентов, получивших трансфузии КТК, и составили вес  $76,8 \pm 6$  кг и поверхность тела  $1,9 \pm 0,1$  м<sup>2</sup>. С учетом антропометрии больных терапевтические дозы ТК и КТК по абсолютному содержанию тромбоцитов не отличались ( $p=0,05$ ), а их значения составили:  $1,2 \times 10^{11}$  на 1 м<sup>2</sup> поверхности тела больного. Используемые дозы ТК и КТК были меньше рекомендованных в 2 раза [142]. Несмотря на снижение дозы в полтора раза относительно рекомендованных мировыми стандартами ( $3,0 \times 10^{11}$ /дозе) клиническая эффективность ТК и КТК определялась высоким содержанием ФАТ – не менее  $80 \times 10^9$ /дозе. Определение содержания ФАТ позволило как оценить эффективность проводимой трансфузионной терапии, так и определять качество ТК и КТК.

После трансфузии ТК и КТК больным не выявлено посттрансфузионных реакций и осложнений. Отмечена коррекция ГС у больных, получивших как трансфузии КТК, так и ТК первых двух суток хранения. Переливание ТК 3-х и 4-х суток хранения не позволило скорректировать ГС. Полученные результаты показали, что более значимым показателем эффективности трансфузии ТК и КТК является не СПТ, а содержание СП ФАТ в крови. Внедрение КК и долгосрочного хранения тромбоцитов позволило проводить дополнительное обследование реципиентов на АТА и подбирать совместимые КТК не только по АВО системе,

но и по антигенам системы HLA и HPA [6]. Индивидуальный подбор, ТК и КТК, проводимый с учетом не только антигенов системы ABO и Резус-фактор, таких как С, с, Е, е и др. оправдан, т.к. во время аппаратной заготовки ТК, или при получении из дозы крови, наблюдается небольшое содержание эритроцитов (не менее  $6 \times 10^9$ /дозе) в дозе ТК [17]. Подбор ТК и КТК в пробах на совместимость с сывороткой реципиента показал, что 80% гемокомпонентов были совместимы. Трансфузии совместимых ТК и КТК были наиболее эффективны как клинически, так и по лабораторным критериям. Концентрация тромбоцитов равная СПТ через 24 часа после окончания трансфузии сохранялась на высоком уровне – до  $59 \times 10^9$ /л – что указывало на большую циркуляцию донорских тромбоцитов в крови реципиентов. За счет высокой эффективности совместимые трансфузии ТК и КТК позволили, в большинстве случаев, не только исключить последующие трансфузии ТК, но и значительно сократить количество трансфузий ЭСК и плазмы в 1,5 и 3 раза соответственно. При этом не удалось выявить закономерность между трансфузионным анамнезом больного и образованием АТА. Вероятно, это связано с тем, что не у всех больных образуются АТА даже после нескольких трансфузий гемокомпонентов. Склонность к антителообразованию зависит от HLA- и HPA-генотипа, иммуногенности HPA [8]. Генетические маркеры предрасположенности к инициации гуморального иммунного ответа на аллоантигены систем HPA и HLA являются определяющими [9, 104]. Итогом всей работы стали результаты экономической целесообразности, проводимой гемокомпонентной терапии с учетом индивидуальной совместимости. Расчеты стоимости гемокомпонентов и теста на совместимость тромбоцитов показали, что меньшее использование гемокомпонентов после совместимой трансфузии ТК или КТК значительно, а именно в 2 раза (в среднем на 35000 руб.), сокращает расходы на трансфузионную терапию. Ранее Головкина Л.Л. и соавт. также показали экономию до 1050 Евро/месяц на аллоиммунизированного гематологического больного при подборе и трансфузии индивидуально совместимых ТК [152]. Подбор ТК и КТК с учетом индивидуальной совместимости с реципиентами повысил эффективность

гемокомпонентной терапии и продлил время циркуляции донорских тромбоцитов в крови реципиентов.

Заметно увеличить ресурсный потенциал тромбоцитных компонентов позволит КК тромбоцитов. Создание банков КТК позволит решить сразу несколько проблем: 1 – увеличит срок хранения ТК; 2 – создаст возможность карантинизации ТК; 3 – позволит создавать базы ТК с различными генотипами, в том числе – редкими. Оценка экономической эффективности КК ТК показала, что внедрение предложенного метода позволит в среднем в 2 раза сократить стоимость одной трансфузии. Таким образом, создание банков КТК представляется важной стратегической задачей. Оценка гемосовместимости представляется экономически оправданной процедурой – так, анализ стоимости гемокомпонентной терапии показал, что ее себестоимость для больных, получивших совместимую трансфузию ТК и КТ, в среднем составляет 38320 руб., что в 2 раза меньше по сравнению со стоимостью 73636 руб. для больных, ранее получивших несовместимую трансфузию ТК или КТК.

Разработанный метод получения КТК основан на стандартных технических возможностях и потенциально может быть автоматизирован. В настоящее время на всех этапах КК необходимо личное участие опытных сотрудников – особенно в части работы с оценкой качества тромбоцитов. Нужно признать, что автоматизация работы с компонентами крови представляет определенную трудность. Существующие методики аппаратной оценки качества нефиксированных клеток пока не могут быть использованы в трансфузиологической практике. Кроме того, уровень развития техники также не позволяет оперативно решить проблему автоматизации предложенного нами метода. Безусловно, усовершенствование лабораторной и технологической базы в области КК тромбоцитов представляет актуальную задачу.

## Заключение

В диссертационной работе представлены оригинальные технологические принципы заготовки ТК и КК тромбоцитов, позволившие повысить качество тромбоцитных компонентов и их клиническую эффективность.

Основные итоги выполненного исследования заключаются в следующем:

Производство тромбоцитных компонентов следует проводить с учетом ФАТ доноров. Скрининг доноров по ФАТ до цитафереза позволяет обеспечить высокое качество тромбоцитных компонентов. Во время хранения ТК при температуре от 20 до 24<sup>0</sup>С и непрерывном помешивании ФАТ значительно снижается через 3 суток и остается низкой (не более 10%) в до конца хранения (до 5-х суток).

Разработанный способ и устройства для КК тромбоцитов, позволяют получать тромбоцитные компоненты длительного хранения с высокой сохранностью ФАТ.

Длительное хранение КТК (до 24 месяцев) в замороженном состоянии обеспечивает возможность проведения карантинизации и их выбраковки по трансмиссивным опасным инфекциям – гепатит В и С, ВИЧ.

Объективизация клинической эффективности трансфузии ТК и КТК определяется СП ФАТ в крови реципиента после окончания трансфузии.

Наибольшая клиническая эффективность и СП ФАТ в крови реципиентов после окончания трансфузии наблюдается у ТК первых двух-трех суток хранения с момента заготовки; а ТК трех-пяти суток хранения менее эффективны.

Клиническая эффективность КТК сопоставима с эффективностью ТК двух-трех суток хранения.

Создание банков КТК и внедрение в широкую практику новых способов хранения тромбоцитов имеет стратегическое значение для работы всей службы крови. Разработанный способ получения КТК уже внедрен в производство как в

ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», так и в ГБУЗ ВО ОСПК (г. Владимир) и ГБУЗ ТО ОСПК (г. Тюмень). Необходимо расширение взаимодействия ЛПУ с научно-исследовательскими коллективами, с целью внедрения и апробации существующих методик работы с тромбоцитами, а также их оптимизации. С учетом того, что тромбоциты человека имеют потенциальную ценность для регенеративной медицины, биоинженерии, КК тромбоцитов позволит заготавливать и хранить большие резервы биологического материала, пригодного для решения самых разных научных и клинических задач. Для реализации этих принципов предложена современная модель обеспечения тромбоцитными компонентами. Современная модель обеспечения гемокомпонентами предусматривает следующее: круглосуточную работу отделения или кабинета трансфузиологии в ЛПУ; круглосуточную работу экспедиции СПК; регулярное производство и поддержание стратегического запаса КТК на СПК; наличие стратегического запаса КТК в ЛПУ; круглосуточная передача РТ из СПК в ЛПУ; регулярное пополнение запасов в ЛПУ замороженными КТК.

Учитывая короткий срок хранения ТК и снижение качества тромбоцитов КК и длительное хранение КТК является единственным способом формирования достаточных стратегических запасов, доступных для больных круглосуточно, независимо от производства ТК. Идеальная модель обеспечения безопасными тромбоцитными гемокомпонентами – формирование стратегического запаса аутологичных тромбоцитных компонентов длительного хранения, и трансфузия их реципиенту по строгим показаниям гарантирует как иммунную, так и инфекционную безопасность.

## Выводы

1. В крови доноров и в тромбоцитных концентратах выявлена вариабельность количества функционально активных тромбоцитов. В процессе хранения содержание функционально активных тромбоцитов в тромбоцитных концентратах значительно снизилось с 52% (0 день) до  $20\pm 8\%$  (на 3-й день) и до  $0,8\pm 1\%$  (на 5-й день).

2. Разработанный способ криоконсервирования тромбоцитов с учетом морфофункциональной активности клеток и устройства, представляющие замкнутую систему, обеспечивают надежное замораживание и хранение тромбоцитов, а также эффективную подготовку к трансфузии и хранение.

3. Сохранность функциональной активности тромбоцитов в тромбоцитных концентратах после криоконсервирования тромбоцитов зависит от исходных морфофункциональных характеристик тромбоцитов. Наиболее пригодными для криоконсервирования представляются тромбоцитные концентраты, где общее содержание тромбоцитов исходно –  $200-250 \times 10^9$ /дозе, относительное содержание функционально активных тромбоцитов – 50-75%, содержание функционально активных тромбоцитов –  $100-180 \times 10^9$ /дозе. В таких тромбоцитных концентратах сохранность функционально активных тромбоцитов после криоконсервации варьирует от 40 до 70%.

4. Криоконсервирование тромбоцитов позволяет проводить их карантинизацию и выбраковку по ВИЧ, Гепатиту В и С и предупредить передачу опасных инфекций от донора – реципиенту. Заготовленные предложенным способом тромбоциты клинически эффективны. Наиболее высокая клиническая эффективность выявлена у тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов, содержащих от 80 до  $140 \times 10^9$  функционально активных тромбоцитов в дозе.

5. Разработанный новый параметр оценки эффективности трансфузии тромбоцитов – скорректированный прирост функционально активных тромбоцитов – позволяет определить прирост функционально активных

тромбоцитов в крови реципиента. Для эффективной коррекции тромбоцитопении скорректированный прирост функционально активных тромбоцитов через 1 час составляет не менее  $27 \times 10^9/\text{л}$ , а через 24 часа –  $23 \times 10^9/\text{л}$ .

6. Показано, что индивидуальный подбор и трансфузия тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов, совместимых с реципиентами не только по антигенам системы АВО и Резус-фактора, но и по антигенам лейкоцитов человека и антигенам тромбоцитов человека, продлевает время циркуляции донорских тромбоцитов в крови реципиента более суток.

## Практические рекомендации

1. Для заготовки тромбоцитных концентратов высокого качества следует обследовать доноров на содержание функционально активных тромбоцитов и направлять на тромбоцитаферез лиц с содержанием в крови функционально активных тромбоцитов более 50%.
2. Для криоконсервирования тромбоцитов рекомендуется использовать тромбоцитные концентраты, полученные методом афереза, с содержанием функционально активных тромбоцитов не менее 50%. Такие тромбоцитные концентраты от одного донора имеют один иммунный профиль и удобны для проведения карантинизации гемокомпонента.
3. Тромбоциты следует криоконсервировать с использованием комбинированного криопротектора на основе диметилсульфоксида в замкнутой системе автоматизированным методом.
4. Технология криоконсервирования позволяет повысить срок хранения тромбоцитных концентратов в 150 раз с сохранением функционально активных тромбоцитов, а также обеспечить инфекционную и иммунологическую безопасность гемотрансфузии.
5. Клиническая эффективность тромбоцитных концентратов определяется не столько количеством тромбоцитов, сколько их функциональной активностью. Лечебная доза тромбоцитного концентрата должна содержать не менее  $80 \times 10^9$  функционально активных тромбоцитов.
6. При назначении трансфузии тромбоцитного концентрата следует учитывать, что функциональная активность тромбоцитов значительно снижается через 3-е суток хранения тромбоцитных концентратов и для получения выраженного клинического эффекта следует скорректировать дозу назначаемого тромбоцитного концентрата.

7. Для обеспечения инфекционной безопасности следует проводить карантинизацию тромбоцитных компонентов.

8. Индивидуальный подбор тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов с учетом антигенов системы АВ0, Резус-фактор, а также антигенами лейкоцитов человека и антигенами тромбоцитов человека значительно повышает клиническую эффективность тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов; снижает потребность в эритроцитсодержащих компонентах и свежзамороженной плазме и стоимость гемокомпонентной терапии.

**Список сокращений и условных обозначений**

АТА – антитромбоцитарные антитела

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГС – геморрагический синдром

ГЭК – гидрокиэтилкрахмал

ДМАЦ – диметилацетамид

ДМСО – диметилсульфоксид

ИК – искусственное кровообращение

ИФА – иммуноферментный анализ

КК – криоконсервирование

КП – криопротектор

КТК – криоконсервированные тромбоциты

ЛЦТ – лимфоцитотоксический тест

НД – нормативные документы

РТ – размороженные тромбоциты

СЗП – свежезамороженная плазма

СПТ – скорректированный прирост тромбоцитов

СП ФАТ – скорректированный прирост функционально активных тромбоцитов

ТК – тромбоцитные концентраты

ТЭГ – тромбоэластография

ФАТ – функционально активные тромбоциты

ЭСК – эритроцитсодержащие компоненты

ЭКМО – экстракорпоральная мембранная оксигенация

ААВВ – Американская ассоциация банков крови

HLA – Human Leucocyte Antigen (антигены лейкоцитов человека)

HPA – Human Platelet Antigen (антигены тромбоцитов человека)

ISBT – международное общество переливания крови

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аграненко, В.А. Кримоконсервированные тромбоциты и их клиническая эффективность [Текст] / В.А. Аграненко, Ф.Э. Файнштейн, В.Л. Голубева // Гематология и трансфузиология. – 1987. – Т. 32, № 5. – С. 8–12.
2. Азовская, С.А. Кримоконсервирование тромбоцитов и их функциональная полноценность [Текст] / С.А. Азовская, Р.И. Волкова, В.Ф. Соколов // Гематология и трансфузиология. – 1995. – Т. 40. – № 5. – С. 44–46.
3. Аллоиммунизация тромбоцитами антигенами кардиохирургических больных после трансфузионной терапии [Текст] / И. В. Плугарёва [и др.] // Проблемы заместительной терапии концентратами тромбоцитов: материалы научно-практической конференции. – М., 2010. – С.46-47.
4. Бутина, Е.В. Эффективность иммунологического подбора доноров тромбоцитов [Текст] / Е.В. Бутина, Г.А. Зайцева, Ф.С. Шерстнев // Проблемы заместительной терапии концентратами тромбоцитов: материалы научно-практической конференции. – М., 2010. – С.36-37.
5. Высочин, И.В. Кримоконсервирование тромбоцитов. Технологические подходы замораживания и методы контроля качества (обзор литературы) [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // Трансфузиология. –2012. –Т. 13, № 4. –С. 31-41.
6. Высочин, И.В. Обеспечение иммунологической и инфекционной безопасности путем кримоконсервирования тромбоцитов [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, А.И. Костин // Трансфузиология. – 2016. – Т. 17, № 2. Прил. 1: Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства крови: тезисы докл. II Евраз. конгр. – С.14-15.
7. Высочин, И.В. Морфофункциональный анализ тромбоцитов доноров в процессе хранения [Текст] / И.В. Высочин, М.С. Макаров, В.Б. Хватов // Актуальные вопросы нефрологии, диализа, хирургической гемокоррекции и гемафереза: сб. тез. ежегодн. науч.-практ. конф. ЦФО РФ совм. с 22-й конф. Моск. о-ва гемафереза, (г. Москва-Углич, 20-22 мая 2014г). - М.; Углич, 2014. - С.17.

8. Головкина, Л.Л. Антигены тромбоцитов и их значение в медицине [Текст] / Л.Л. Головкина // Гематология и трансфузиология. – 2010. – Т.55, № 4. – С. 24-31.
9. Головкина, Л.Л. Рестрикция гуморального иммунного ответа на антигены тромбоцитов систем HPA и HLA у гематологических больных [Текст] / Л.Л. Головкина, Г.В. Атрощенко, Т.Д. Пушкина // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т.59, - № 1. – С. 39-40.
10. Губанова, М.Н. Инактивация патогенов в клеточных компонентах крови [Текст] / М.Н. Губанова, И.Г. Чемоданов, В.В. Гайворонская // Трансфузиология. - 2017.- Т.18, № 3.- С.15-36.
11. Долгосрочные результаты лечения больных острыми миелоидными лейкозами по протоколу российского многоцентрового рандомизированного исследования омл-10 [Текст] / В.Г. Савченко [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2016. – № 2. – С. 60-65.
12. Дополнительные критерии оценки состояния здоровья доноров аппаратного тромбоцитафереза [Текст] / С.В. Варламова [и др.] // Гематология и трансфузиология. –2014. –Т. 59, № 1. – С. 19-25.
13. Жибурт, Е.Б. Заготовка и переливание тромбоцитов: рук-во для врачей [Текст] / Е.Б. Жибурт, С.Р. Мадзаев. – М.: РАЕН, 2013. – 376 с.
14. Журавлёв В.В. Клинико-экономический анализ переливания тромбоцитных концентратов у больных онкогематологическими заболеваниями [Текст] / В. В. Журавлёв // Гематология и трансфузиология. - 2010. - Т.55, № 5: Проблемы заместительной терапии концентратами тромбоцитов: материалы науч.-практ. конф., (г. Москва, 19 октября 2010г). – М. – 2010. – С.42-43.
15. Журавлев, В.В. Снижение риска посттрансфузионных реакций в результате переливания индивидуально подобранных тромбоцитных концентратов [Текст] / В.В. Журавлев, Г.В. Атрощенко, Л.Л. Головкина // Гематология и трансфузиология. - 2010. - Т.55, № 5: Проблемы заместительной терапии концентратами тромбоцитов: материалы науч.-практ. конф., (г. Москва, 19 октября 2010г). – М. – 2010. – С.41-42.

16. Зайцева, Г.А. Показатели гомеостаза у различных категорий доноров [Текст] / Г.А. Зайцева, М.Е. Ковтунова, Н.В. Исаева // Вестник службы крови России. –2013. –№ 4. – С. 20-22.
17. Зотиков, Е.А. Тромбоциты и антитромбоцитарные антитела [Текст] / Е.А. Зотиков, А.Г. Бабаева, Л.Л. Головкина. – М.: Монолит, 2003. – 128 с.
18. Компаниец, А.М. Консервирование концентратов тромбоцитов и их лечебная эффективность [Рукопись]: дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.29. – Гематология и переливание крови / А.М. Компаниец. - М., 1992. – 241с.
19. Компанієць, А.М. Дослідження морфофункціональної збереженості тромбоцитів на етапах криоконсервування [Текст] / А.М. Компанієць, О.В. Книш, Т.М. Гуріна // Пробл. криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2.– С. 182–191.
20. Компаниец, А.М. Криоконсервирование тромбоцитов с веществами ряда полиолов [Текст] / А.М. Компаниец, А.В. Николенко, В.И. Луговой // Труды Междунар. конф. по криобиологии. – Харьков, 1992. – С. 86.
21. Лебедева, Е.А. Клиническая эффективность концентрата тромбоцитов у гематологических больных [Текст] / Е.А. Лебедева, С.Ю. Ефимова // Проблемы гематологии и переливания крови. – 2000.– № 2.– С. 27–28.
22. Льюис, С.М. Практическая и лабораторная гематология [Текст] / С.М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс // пер. с англ. под ред. А.Г.Румянцева. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 672с.
23. Мазуров, А.В. Физиология и патология тромбоцитов [Текст] / А.В. Мазуров. – М.: Литерра, 2011. – 480 с.
24. Макаров, М.С. Морфологическая оценка адгезивной активности тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания [Текст] / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова // Клиническая лабораторная диагностика. –2013. – № 7. –С. 58-61.
25. Методы долгосрочного хранения в замороженном состоянии эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, предназначенных для трансфузий [Текст]: метод. письмо / ЦОЛИПК; сост.: Ф.Р. Виноград-Финкель [и др.]. – М., 1969. — 60 с.

26. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания [Текст] / М.С. Макаров [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 9. – С. 388-391.
27. Николенко, А.В. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов [Рукопись]: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.22 – Криобиология / А.В. Николенко. – Х., 1991. – 129 с.
28. Николенко, А.В. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов [Текст] / А.В. Николенко, А.М. Компаниец, В.И. Луговой // Проблемы криобиологии. – 1995. – №4. – С. 36–40.
29. Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии: Постановление Правительства Российской Федерации от 26 января 2010 № 29. – М., 2010.
30. Основные показатели деятельности службы крови Российской Федерации [Текст] / А.В. Четкин [и др.] // Трансфузиология. – 2018. – Т. 19, № 3. – С. 4-13.
31. Пат. 2485502 Российская Федерация, МПК51 G01N 33/48 Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека / М.Ш. Хубутия, М.С. Макаров, В.Б. Хватов, И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, Н.В. Боровкова, О.И. Конюшко; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – 2012105560/15; заявл. 17.02.2012; опубл. 20.06.2013. – Бюл. № 17. – 7с.
32. Потапский, В.М. Алгоритм активизации донорского движения среди студентов и курсантов учебных заведений Москвы [Текст] / В.М. Потапский, Е.И. Неминая // Трансфузиология. – 2011. – Т.12, № 3. – С. 4-16.
33. Правила и протоколы переливания крови [Текст] / Е.Б. Жибурт [и др.] // Национальный медико-хирургический центр имени Н.И. Пирогова. – М.– 2014. – 32 с.
34. Приказ МЗ РФ от 14.09.2001 г. № 364 «Об утверждении порядка медицинского обследования донора крови и ее компонентов».

35. Приказ МЗ РФ от 25.11.2002 г. N 363 «Инструкция по применению компонентов крови».
36. Приказ МЗ РФ от 02.04.2013 г. № 183н «Правила клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».
37. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения [Текст] / М.С. Макаров [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. – № 30. – С. 83-87.
38. Протопопова, Е.Б. Качество регулярных донаций тромбоцитов [Текст] / Е.Б. Протопопова, Н.Г. Филина, Н.С. Кузьмин // Вестник службы крови России. – 2015. – № 2. – С. 35-38.
39. Рагимов, А.А. Общая характеристика трансфузиологических методов гемокоррекции и методов экстракорпоральной гемокоррекции. // Трансфузиологическая гемокоррекция: учебное пособие для врачей под ред. А.А.Рагимова [Текст] / А.А. Рагимов, И.Н. Соловьева. – М.: Практическая медицина, 2008. – С. 29-61.
40. Ронин, В.С. Способ окраски тромбоцитов для подсчета в счетной камере [Текст] / В.С. Ронин // Лаб. дело. – 1983.– №1.– С. 61–62.
41. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови // Европейский директорат по качеству лекарственных средств и здравоохранения. – 17-е изд. – Страсбург. – 2013. – 565 с.
42. Свойства комбинированного консерванта для замораживания тромбоцитных концентратов [Текст] / К.А. Ветошкин [и др.] // Пермский медицинский журнал. – 2013. – № 6. – С. 87-92.
43. Сидоров, С.К. Стандарты и индивидуальные подходы в клинической трансфузиологии [Текст] / С.К. Сидоров, И.Г. Чемоданов, Р.Ф. Аюпова // Трансфузиология. – 2017. – Т.18, № 2. – С. 55-60.
44. Совершенствование технологии криоконсервирования тромбоцитного концентрата при сверхнизкой температуре [Текст] / Ш.М. Багаутдинов [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2010. – № 5. – С. 37.

45. Современные технологические подходы к обеспечению вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов человека [Текст] / Э.Ю. Кудашева [и др.] // Успехи современного естествознания. 03.01.00 Физико-химическая биология. – 2015. – № 5. – С. 132-138.
46. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике [Текст] / М.С. Макаров [и др.] // Медицинский алфавит. - 2012. - № 3. - С.32-34.
47. Сравнительное изучение криопротекторных свойств диметацетамида и диметилсульфоксида при хранении тромбоцитов в условиях умеренных температур [Текст] / С.А. Азовская [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 1989. – № 12. – С. 18-21.
48. Степанова, И.П. Состояние и актуальные задачи службы крови в России [Текст] / И.П. Степанова, Е.В. Белов, Е.А. Селиванов // Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: материалы научно-практ. конф. – СПб, 2000. – С. 4–7.
49. Трансфузиология. Национальное руководство [Текст] / под ред. А.А. Рагимова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 1104 с.: ил.
50. Техническое руководство американской ассоциации банков крови: пер. с англ. – Милан, Европейская школа трансфузионной медицины, 2000. – 1056 с.
51. Тюрин, И.А. Методика газохроматографического определения диметилсульфоксида и возможности применения ее в медицине [Текст] / И.А. Тюрин, А.Е. Ключев А.Е., И.В. Высочин // Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ: материалы VI научно-практической конференции. – М., 2013. – С. 42-43
52. Федотенков, А.Г. К вопросу о токсичности диметилсульфоксида [Текст] / А.Г. Федотенков, И.Д. Шишкина, Л.А. Данилова // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1969. - № 5. – С. 36-38.
53. Фефелова, И.В. Криоконсервирование тромбоцитов с диметилсульфоксидом [Текст] / И.В. Фефелова, Д.М. Мхеидзе, Г.Д. Селидовкин // Гематология и трансфузиология. – 1991.— № 6.— С. 30—32.

54. Хубутя, М.Ш. Производство и клиническое применение криоконсервированных тромбоцитов и тромбоцитных концентратов [Текст] / М.Ш. Хубутя, И.В. Высочин, М.С. Макаров // Вестник службы крови России. – 2015. – № 3. – С. 45-51.
55. Шерстнев, Ф. С. Эффективность трансфузий криоконсервированных донорских тромбоцитных концентратов в гематологической клинике [Текст] / Ф.С. Шерстнев, А.А. Костяев, Т.П. Загоскина // Пермский медицинский журнал. – 2012. – С. 5-10.
56. Энциклопедия клинической онкологии [Текст] / под. ред. М.И. Давыдова. – М.: ГУ РОНЦ им. Блохина РАМН, 2004. - 1456с.
57. Эффективность криоконсервирования при  $-80^{\circ}\text{C}$  тромбоцитных концентратов для клинического применения [Текст] / Ф.С. Шерстнев [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2017. – С. 59-64.
58. A comparison of frozen and fresh platelet concentrates in the support of thrombocytopenic patients [Text] / B.L. Towell [et al.] // Transfusion. — 1986. — Vol. 26, N 6. - P. 525—530.
59. Agranenko, V.A. Factors influencing on the efficacy of platelet transfusion therapy [Text] / V.A.Agranenko, A.M. Kompaniets // Proceedings of XXIII Congress of ISBT. – Amsterdam, 1994. – P. 94.
60. Angelini, A. Evaluation of four different methods for platelet freezing. In vitro and in vivo studies [Text] / A. Angelini, A. Dragani, A. Berardi // Vox Sang. — 1992. — Vol. 62, N 3. - P. 146-51.
61. A randomized controlled trial evaluating recovery and survival of 6% dimethyl sulfoxide-frozen autologous platelets in healthy volunteers [Text] / L.J. Dumont [et al.] // Transfusion. – 2013. – Vol. 53, N 1 – P. 128–137.
62. Armitage, W. J. Transport of 5-hydroxytryptamine by human platelets incubated in glycerol [Text] / W.J. Armitage // Transfusion. — 1982. — Vol. 22, N 3. – P. 203—205.

63. Armitage, W. J. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets [Text] / W.J. Armitage // *Cryobiology*. — 1986. — Vol. 23, N 2. - P. 116—125.
64. Arnaud, F.G. Frozen/thawed platelets: importance of osmotic tolerance and platelet subpopulations [Text] / F.G. Arnaud // *Cryobiology*. – 1999. – Vol. 38, N3. – P. 192–199.
65. Arnaud, F.G. Cryopreservation of human platelets with 1.4m glycerol at –196°C [Text] / F.G. Arnaud, D.E. Pegg // *Thrombos. Res.* — 1989. —Vol. 53, N 6. – P. 585-594.
66. Arnaud, F.G. Permeation of glycerol and propane-1,2-diol into human platelets [Text] / F.G. Arnaud, D.E. Pegg // *Cryobiology*. — 1990. — Vol. 27, N 2. - P. 107-118.
67. Arnaud, F.G. Some effects of propane-1,2-diol on human platelets [Text] / F.G. Arnaud, C.J. Hunt, D.E. Pegg // *Cryobiology*.— 1990.— Vol. 27, N 2. - P. 119-129.
68. Arnaud, F.G. Cryopreservation of human platelets with propane-1,2-diol [Text] / F.G. Arnaud, D.E. Pegg // *Cryobiology*. – 1990. – Vol. 27, N 2. – P. 130–136.
69. Arnaud, F.G. Cryopreservation of human platelets with 1.4 M glycerol at –75 degrees C in PVC blood packs [Text] / F.G. Arnaud, D.E. Pegg // *Thromb. Res.* – 1990. – Vol. 57, N6. – P. 919–924.
70. A therapeutic platelet transfusion strategy is safe and feasible in patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation [Text] / H. Wandt [et al.] // *Bone Marrow Transplant.* – 2006. – Vol. 37, N 4. – P. 387-392.
71. Autologous cryopreserved platelets and prophylaxis of bleeding in autologous bone marrow transplantation [Text] / G. W. van Imhoff [et al.] // *Blut.*– 1983.– Vol. 47, N 2.– P. 203–209.
72. Autologous platelet transfusion in patients receiving high-dose chemotherapy and circulating progenitor cell transplantation for stage II/III breast cancer [Text] / P. Pedrazzoli [et al.] // *Haematologica*. – 1998. – Vol. 83, N 8. – P. 718– 723.
73. Autologous transplantation of a bone marrow graft manipulated by chemoseparation to eliminate residual tumor cells [Text] / M. Korbling [et al.] //

International Congress International Society of Hematology and International Society of Blood Transfusion: Abstracts. — Budapest, 1982. — P. 285.

74. Blood collection and transfusion in the United States in 2001 [Text] / M.T. Sullivan [et al.] // *Transfusion*. — 2007. — Vol. 47, N 3. — P. 385–394.

75. Blood Policy and Technology (Washington, DC: U.S. Congress, Office of Technology Assessment, OTA-H-260, January 1985).

76. British Committee for Standards in Hematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy [Text] / D. Provan [et al.] // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 120, N 4. — P. 574-596.

77. British Committee for Standards in Haematology, Blood Transfusion Task Force: Guidelines for the use of platelet transfusions [Text] // *Br. J. Haematol.* — 2003. — Vol. 122, N 1. — P. 10 – 23.

78. British Committee for Standards in Hematology. Guidelines on the management of massive blood loss [Text] // *Br. J. Haematol.* — 2006. — Vol. 135, N 5. — P. 634-641.

79. Bohonek, M. Frozen platelets in clinical use [Text] / M. Bohonek, L. Landova, D. Kutak // *Vox Sang.* — 2016. — V. 111, Suppl. 1. — P. 60-61.

80. Cerus - Home [Electronic source]. URL: <http://www.cerus.com/> (accessed: 08.12.2017).

81. Characterization of procoagulant extracellular vesicles and platelet membrane disintegration in DMSO-cryopreserved platelets [Text] / T.Z. Tegegn [et al.] // *J Extracell Vesicles*. — 2016. — Vol. 5, N 1. — P. 304-322.

82. Cohen, P. Platelet preservation. IV. Preservation of human platelet concentrates by controlled slow freezing in a glycerol medium [Text] / P. Cohen, F.H. Gardner // *N. Engl. J. Med.* — 1966. — Vol. 274, N 25. — P. 1400—1407.

83. Comparison of functional fibrinogen assessment using thromboelastography with the standard von Clauss method [Text] / I. Fluger [et al.] // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* — 2012. — Vol. 156, N 3. — P. 260–261.

84. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass [Text] / S.F. Khuri [et al.] // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1999. – Vol. 117, N 1. – P. 172-183.
85. Comparison of various dimethylsulphoxide containing solutions for cryopreservation of leucoreduced platelet concentrates [Text] / M.J. Dijkstra-Tiekstra [et al.] // *Vox. Sang.* – 2003. – Vol. 85, N 4. – P. 276–282.
86. Controlled-rate versus uncontrolled-rate freezing as predictors for platelet cryopreservation efficacy [Text] / B. Balint // *Transfusion.* – 2006. – Vol. 46, N 2. – P. 230–235.
87. Crowely, J.P. Changes in platelet shape and structure after freeze preservation [Text] / J.P. Crowely, A. Rene, C.R. Valeri // *Blood.* — 1974. — Vol. 44, № 4. – P. 599—603.
88. David, N. The Pharmacology of Dimethylsulfoxide 6544 [Text] / N. David // *Annu. Rev. Pharmacol.* – 1972. – Vol. 12, N 2. – P. 353-374.
89. Dayian, G. Differences in human platelet permeability to glycerol and DMSO [Text] / G. Dayian, S.N. Chin, A.W. Rowe // *Cryobiology.* — 1971. — Vol. 8, N 4. – P. 376.
90. Dayian, G. Cryoprotection of human platelets: The influence of cooling rate and glycerol concentration on activation of the lysosomal enzyme,  $\beta$ -glucuronidase [Text] / G. Dayian, S.N. Chin, A.W. Rowe // *Cryobiology.*— 1971.— Vol. 8, N 4. – P. 393—394.
91. Dayian, G. Activation of lysosomal enzymes in human platelets during cryopreservation [Text] / G. Dayian, A. W. Rowe // *Cryobiology.* — 1970. — Vol. 6, N 6. – P. 579—580.
92. Dayian, G.M. Cryopreservation of human platelets for transfusion: a glycerol-glucose, moderate rate cooling procedure [Text] / G.M. Dayian, A.W. Rowe // *Cryobiology.* — 1976. — Vol. 13, N 1. — P. 1—8.
93. Development of optimal techniques for cryopreservation of human platelets. I. Platelet activation during cold storage (at 22 and 8 degrees C) and cryopreservation [Text] / D.Y. Gao [et al.] // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 38, N 3. – P. 225–235.

94. Dimethylacetamide, a New Cryoprotective Agent for Platelets [Text] / S. Djerassi [et al.] // *Transfusion*. — 1971. — Vol. 11, N 2 — P. 72—76.
95. Dimethyl Sulfoxide Inhibits Tissue Factor Expression, Thrombus Formation, and Vascular Smooth Muscle Cell Activation: A Potential Treatment Strategy for Drug-Eluting Stents [Text] / G.G. Camici [et al.] // *Circulation*. — 2006. — Vol. 114, — N 14. — P. 1512-1521.
96. DMSO inhibits human platelet activation through cyclooxygenase-1 inhibition. A novel agent for drug eluting stents? [Text] / L. Asmis [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2010. — Vol. 391, N 4. — P. 1629–1633.
97. Do basic laboratory tests or clinical observation predict bleeding in thrombocytopenic oncology patients? [Text] / A.M. Friedman [et al.] // *Transfus. Med. Rev.* — 2002. — N 16. — P. 34-45.
98. Effect of platelet transfusion on hemorrhage in patients with acute leukemia [Text] / T. Han [et al.] // *Cancer*. — 1966. — Vol. 19, N 12. — P. 1937-1942.
99. Efficacy of HLA-matched platelet transfusions for patients with hypoproliferative thrombocytopenia: a systematic review [Text] / K. Pavenski [et al.] // *Transfusion*. — 2013. — Vol. 53, N 10. — P. 2230-2242.
100. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates [Text] / C. Wang [et al.] // *Transfusion science*. — 1999. — Vol. 20, - N 2. — P. 129-139.
101. Frozen blood products: clinically effective and potentially ideal for remote Australia [Text] / A. Holley [et al.] // *Anaesth Intensive Care*. — 2013 — Vol. 41, N 1. — P. 10-19.
102. Frozen platelets for rural Australia: the CLIP trial [Text] / M.C. Reade [et al.] // *Anaesth Intensive Care*. — 2013. — Vol. 41, N 6. — P. 804–805.
103. Gender Dependence for a Subset of the Low-Abundance Signaling Proteome in Human Platelets [Text] / O. Eidelman [et al.] // *Human Genomics and Proteomics*. — 2010. — Vol. 2010: 164906.

104. Genetic risk factors in humoral immune response to platelet antigens HLA and HPA systems in multitransfused hematological patients [Text] / L.L. Golovkina [et al.] // *Haematologica*. – 2015. – Vol. 100, N S1. – P. 630.
105. Gernsheimer, T.B. Platelet transfusion in the 21<sup>st</sup> century: where we've been and where we're going [Text] / T.B. Gernsheimer // *ISBT Science Series*. - 2011. - Vol.6, N.1 Special Issue: State of the Art Presentations. 21<sup>st</sup> Region. Congr. the ISBT, (Europe – Lisbon, Portugal, June 18–22. – 2011). - P. 245-248.
106. Haemostasis and Thrombosis Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias [Text] / S.L. Allford, B.J. Hunt, P. Rose, S. Machin // *Br. J. Haematol.* – 2003. – Vol. 120, N 4. – P. 556-573.
107. Heal, M.H. Optimizing platelet transfusion therapy [Text] / M.H. Heal, N. Blumberg // *Blood Rev.* – 2004. – Vol. 18, N 3. – P. 149-165.
108. Houseworth, J. L. Use of the Trima accel to collect platelets from pregnant patients for treatment of nait [Text] / J.L. Houseworth // *Abstracts from the American Society for Apheresis 26 annual meeting, (2005, April 27-30; Chicago, Illinois)*. – P. 26.
109. Inactivation of viruses in platelet and plasma products using a riboflavin-and-UV-based photochemical treatment [Text] / S.D. Keil [et al.] // *Transfusion*. – 2015. – Vol. 55, N 7. – P. 1736-1744.
110. INTERCEPT® Blood System for Platelets –Dual Storage (DS) Processing Set Rx Only Caution: US Federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare practitioner [Electronic source]. – URL: <https://www.fda.gov/downloads/biologicsbloodvaccines/bloodbloodproducts/approvedproducts/premarketapprovalspmas/ucm427522.pdf> (accessed: 06.12.2017).
111. In vitro evaluation of the hemostatic effectiveness of cryopreserved platelets [Text] / Cid. J. Escolar [et al.] // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, N 3. – P. 580–586.
112. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications [Text] / L. Johnson [et al.] // *Transfusion*. – 2015. – Vol. 55, N 4. – P. 838–847.

113. Jacob, W. Pharmacology of DMSO [Text] / W. Jacob, R. Herschler // *Cryobiology*. — 1986. — Vol. 23, N 1. - P. 14—27.
114. Johnson, L. The hemostatic activity of cryopreserved platelets is mediated by phosphatidylserine-expressing platelets and platelet microparticles [Text] / L. Johnson, C.P. Coorey, D.C. Marks // *Transfusion*. — 2014. — Vol. 54, N 8. — P. 1917–1926.
115. Johnson, L.N. The Australian experience with deep frozen blood products [Text] / L.N., S.J. Reid, K.M. Winter // 32rd International Congress of the ISBT, Cancun, Mexico, July 2012.
116. Journal officiel de la Republique francaise - N 276 du 28 novembre 2010. 2010. — P. 1–44.
117. Kelly, K. Frozen platelets [Text] / K. Kelly, L.J. Dumont // *Transfusion Apher Sci*. — 2018. — pii: S1473-0502(18)30483-X. [Epub ahead of print].
118. Kotelba-Witkowska, B. Cryopreservation of platelet concentrates using glycerol-glucose [Text] / B. Kotelba-Witkowska, C.A. Schiffer // *Transfusion*. — 1982. — Vol. 22, № 2. - P. 121—124.
119. Levi, M. Current understanding of disseminated intravascular coagulation [Text] / M. Levi // *Br. J. Haematol*. — 2004. — Vol. 124, N 5. — P. 567-576.
120. Low level of procoagulant platelet microparticles is associated with impaired coagulation and transfusion requirements in trauma patients [Text] / N.A. Windelov [et al.] // *The journal of trauma acute care surgery*. — 2014. — Vol. 77, N 1 – P. 692–700.
121. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi [Text] / M. Łeztowska [et al.] // Warszawa, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, 2014.
122. Meryman, H.T. Cryopreservation of blood cells and other tissues: current status [Text] / H.T. Meryman // *Haematologia (Budap)*. - 1982. - Vol. 15, N 4. - P. 337- 350.
123. Meryman, H. T. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection [Text] / H.T. Meryman, R.J. Williams, M.S. Douglas // *Cryobiology*. — 1977. — Vol. 14, N 3. - P. 287-302.

124. Ministère du travail, de l'emploi et de la santé Décision du 20 octobre 2010 fixant la liste et les caractéristiques des produits sanguins labiles [Text] // J. Republiq. France. – 2010. – N 276, du 28 novembre. – P. 12–64.
125. Nasiri, S. Infusible platelet membrane as a platelet substitute for transfusion: an overview [Text] / S. Nasiri // *Blood Transfus.* – 2013. – Vol. 11, N 3. – P. 337–342.
126. Noorman, F. -80°C Frozen platelets are activated compared to 24 hour liquid-stored platelets and quality of frozen platelets is unaffected by a quick preparation method (15 min) which can be used to prepare platelets for the early treatment of trauma patients in military theatre [Text] / F. Noorman, R. Strelitski, J.F. Badloe // *Transfusion.* – 2012. – Vol. 52, Suppl. 3. – P. 33A.
127. Norman, F. -80°C Frozen red blood cells, plasma and platelets, efficient logistics, available, compatible, safe and effective in the treatment of trauma patients with or without massive blood loss in military theatre [Text] / F. Noorman, J.F. Badloe // *AABB Meeting, (Boston, USA, Oct. 2012).* – Boston, 2012.
128. Odink, J. The influence of DMSO on the serotonin uptake of human platelets [Text] / J. Odink, R. Sprokholt, F.G.J. Offerijns // *Cryobiology.*— 1974.—Vol. 11, N 6.— P. 564.
129. Plasma concentrations and pharmacokinetics of dimethylsulfoxide and its metabolites in patients undergoing peripheral-blood stem-cell transplants [Text] / M.J. Egorin [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 1998. – Vol. 16, N 2. – P. 610-615.
130. Platelet immunopathology and therapy: a Canadian Blood Services Research and Development Symposium [Text] / A.T. Tinmouth [et al.] // *Transfus. Med. Rev.* – 2006. – Vol. 20, N 4. – P. 294-314.
131. Platelet-rich plasma in patients with tibiofemoral cartilage degeneration [Text] / R. Hart [et al.] // *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* –2013. –Vol. 133, N. 9. –P. 1295-1301.
132. Platelet transfusion: a clinical practice guideline from the AABB [Text] / R.M. Kaufman [et al.] // *Ann. Intern. Med.* - 2015. – Vol. 162, N 3. – P.205-213.
133. Platelet transfusion: a systematic review of the clinical evidence [Text] / A. Kumar [et al.] // *Transfusion.*—2015. – Vol. 55, N 5. – P. 1116-1127.

134. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology [Text] / C.A. Schiffer [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2001. – Vol. 19, N 5. – P. 1519-1538.
135. Platelets The INTERCEPT Blood System by Cerus Corporation [Electronic source]. URL: [www.амотосален+УФА.bloodsystem.com](http://www.амотосален+УФА.bloodsystem.com) (accessed: 06.12.2017).
136. Practice Guidelines for Blood Transfusion: A Compilation from Recent Peer-Reviewed Literature. American Red Cross 2002 [Electronic source]. – URL: [http://chapters.redcross.org/br/indianaoh/hospitals/transfusion\\_guidelines.htm](http://chapters.redcross.org/br/indianaoh/hospitals/transfusion_guidelines.htm).re.
137. Preparation and in vivo circulation of human platelets preserved with combined dimethylsulfoxide and dextrose [Text] / I. Djerassi [et al.] // *Transfusion.* – 1966. - Vol. 6, N 6. - P. 572-576.
138. Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol [Text] / Y. Nagata [et al.] // *Genes and Development.* – 2003. – Vol. 17, N 23. –P. 2864–2869.
139. Rao, A. K. Acquired granular pool defect in stored platelets [Text] / A. K. Rao, S. Niewiarowski, S. Murphy // *Blood.*— 1981 — Vol. 57, N 2. - P. 203—208.
140. Rebull, P. Revisitation of the clinical indications for the transfusion of platelet concentrates [Text] / P. Rebull // *Rev. Clin. Exp. Hematol.* – 2001. – Vol. 5, N 3. – P. 288-310.
141. Rebull, P. Platelet transfusion trigger in difficult patients [Text] / P. Rebull // *Transfus. Clin. Biol.* – 2001. – Vol. 8, N 3. – P. 249-254.
142. Recommendations for the transfusion of plasma and platelets [Text] / G. Liumbruno [et al] // *Blood Transfus.* – 2009. – Vol. 7, N 2. – P. 132-150.
143. Redmond, J. Glycerol-glucose cryopreservation of platelet: in vivo and in vitro observations [Text] / J. Redmond, R.B. Bolin, B.A. Cheney // *Transfusion.* — 1983. — Vol. 23, N 3. - P. 213—214.
144. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism: a comparison with conventional platelet storage conditions [Text] / L. Johnson [et al.] // *Transfusion.* – 2016. – Vol. 56, N 7 – P. 1807–1818.

145. Regan, D.M. Comparison of cord blood thawing methods on cell recovery, potency, and infusion [Text] / D.M. Regan, J.D. Wofford, D.A. Wall // *Transfusion*. – 2010. – Vol. 50, N 12. – P. 2670-2675.
146. Review of in vivo studies of dimethylsulfoxide cryopreserved platelets [Text] / S.J. Slichter [et al.] // *Transfusion medicine reviews*. - 2014. - Vol. 28, N 4. - P. 212-225.
147. Safety and efficacy of autologous platelet transfusion in cardiac surgery: comparison of cryopreservation, blood collection on the day before surgery and blood collection during surgery [Text] / M. Yokomuro [et al.] // *Cryobiology*. – 1999. – Vol. 38, N 3. – P. 236–242.
148. Safety and efficacy of cryopreserved autologous platelet concentrates in HLA-alloimmunized patients with hematologic malignancies [Text] / B. Gerber [et al.] // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, N. 10. – P. 2426-2437.
149. Schiffer, C.A. Clinical experience with transfusion of cryopreserved platelets [Text] / C.A. Schiffer, J. Aisner, P.H. Wiernik // *Br. J. Haematol.* — 1976. — Vol. 34, N 3. - P. 377—385.
150. Schiffer, C.A. Frozen autologous platelet transfusion for patients with leukemia [Text] / C.A. Schiffer, J. Aisner, P.H. Wiernik // *N. Engl J. Medicine*. — 1978. — Vol. 299, N 1. - P. 7—12.
151. Schiffer, C.A. Cytopheresis and Plasma Exchange: Clinical Indications [Text] / C.A. Schiffer, J. Aisner, P.H. Wiernik // *Progress in clinical and biological research*. - New York: Alan R. Liss Inc. - 1982. - P. 165-180.
152. Serological compatibility tests in alloimmunized oncohematological patients before platelet transfusions: clinical and economical effectiveness [Text] / L.L. Golovkina [et al.] // *Vox. Sang.* - 2013. - Vol. 105, Suppl. 1. – P. 241-242.
153. Slichter, S.J. Mechanisms and management of platelet refractoriness [Text] / S.J. Slichter // *Transfusion Medicine in the 1990s* / Ed. by S.J. Nance – Arlington, 1990. – P. 95–178.

154. Slichter, S.J. Platelet transfusion: future directions [Text] / S.J. Slichter // *Vox Sang.* – 2004. – Vol. 8, Suppl. 2. – P. 47–51.
155. Smith, J.F. Retention of coagulation factors in plasma frozen after extended holding at 1-6 degrees C [Text] / J.F. Smith [et al.] // *Vox Sang.* – 2000. – Vol. 78, N 1. – P. 28—30.
156. Superior Health Council. Guidelines for the transfusion of platelets (SCH 8068); 2005 [Electronic source]. - URL: [http:// www.health.fgov.be/CSH\\_HGR](http://www.health.fgov.be/CSH_HGR).
157. Taylor, M.A. Cryopreservation of platelets: an in vitro comparison of four methods [Text] / M.A. Taylor // *J. Clin. Pathol.* – 1981. – Vol. 34, N 1. – P. 71–75.
158. The high-order kinetics of cytolysis in stressed red cells [Text] / H.T. Meryman [et al.] // *International Congress International Society of Hematology and International Society of Blood Transfusion: Abstracts.* — Budapest. 1982. — P. 419.
159. The INTERCEPT Blood System by Cerus Corporation [Electronic source]. – URL: <http://interceptbloodsystem.com/> (accessed: 08.12.2017).
160. The management of heparin-induced thrombocytopenia [Text] / D. Keeling [et al] // *Br. J. Haematol.* – 2006. – Vol. 133, N 3.–P. 259-69.
161. The potential of nanoscale combinations of self-assembling peptides and amino acids of the Src tyrosine kinase inhibitor in acute lung therapy [Text] / S.Y. Fung [et al.] // *Biomaterials.* – 2011. – Vol. 32, N 16. – P. 4000-4008.
162. Therapeutic efficacy and safety of platelet treated with a photochemical process for pathogen inactivation the Sprint Trial [Text] / J. McCulloch [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 104, N 5. – P. 1534–1542.
163. The risk of bleeding in thrombocytopenic patients with acute myeloid leukaemia [Text] / K.E. Webert [et al.] // *Haematologica.* – 2006. – Vol. 91, N 11. – P. 1530-1537.
164. The role of growth factors in cartilage repair [Text] / L.A. Fortier [et al.] // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2011. – Vol. 469, N. 10. – P. 2706-2715.
165. Transfusion-related adverse events in the Platelet Dose study [Text] / R.M. Kaufman [et al.] // *Transfusion.* – 2015. – Vol. 55, N 1. – P. 144-153.

166. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial [Text] / S. Patel [et al.] // *Am. J. Sports Med.* –2013. –Vol. 41, N 2 –P. 356-364.
167. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics [Text] / M.G. Egidi [et al.] // *Blood Transfus.* – 2010. – N 8. – P. 73-81.
168. Valeri, C.R. A simple method for freezing human platelets using 6 per cent dimethylsulfoxide and storage at -80 degrees C [Text] / C.R. Valeri, H. Feingold, L.D. Marchionni // *Blood.* – 1974. – Vol. 43, N 1. – P. 131-136.
169. Valeri, C.R. Correlation between in vitro aggregation and thromboxane A2 production in fresh, liquid-preserved, and cryopreserved human platelets: effect of agonists, pH, and plasma and saline resuspension [Text] / C.R. Valeri, H. Macgregor, G. Rago // *Transfusion.* – 2005. –Vol. 45, N 4. – P. 596-603.
170. Valeri, C.R. Freezing human platelets with 6 percent dymethylsulfoxide with removal of the supernatant solution before freesing and storage at –80°C without postthaw processing [Text] / C.R. Valeri, G. Rango, S. Khuri // *Transfusion.*– 2005.– Vol. 45, N 12.– P. 1890–1898.
171. Velden, K. The value of a 51Cr platelet lysis assay as crossmatch test in patients with leukaemia on platelet transfusion therapy [Text] / K. Velden, K. Sintnicolaas, B. Lowenberg // *International Congress International Society of Hematology and International Society of Blood Transfusion: Abstracts.*— Budapest, 1982.— P. 282.
172. Vox Sanguinis International Forum on platelet cryopreservation: Summary [Text] / C.S. Cohn [et al.] // *Vox. Sang.* 2017. – Vol. 112, N 7. – P. 684-688. DOI: 10.1111/vox.12532.
173. World Health Organisation. *The Clinical Use of Blood: Handbook*, WHO; 2001.

## Приложение А

Патент на полезную модель № 169578

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 169578

**УСТРОЙСТВО ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ  
ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы "Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы" (RU)*

Авторы: *Высочин Игорь Валерьевич (RU), Кобзева Елена Николаевна (RU), Хватов Валерий Борисович (RU)*

Заявка № 2016131824

Приоритет полезной модели 03 августа 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре полезных  
моделей Российской Федерации 23 марта 2017 г.Срок действия исключительного права  
на полезную модель истекает 03 августа 2026 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев

**Формула полезной модели**

(Патент на полезную модель № 169578 «Устройство для криоконсервирования тромбоцитов»)

1. Устройство для КК тромбоцитов, включающее три контейнера, где первый предназначен для исходного ТК, второй – для хранения плазмы, полученной в процесс фракционирования исходного ТК, и третий - непосредственно для фракционирования ТК с получением КТК и плазмы и последующим хранением КТК, шприц для введения КП, при этом первый контейнер соединен со вторым, а второй с третьим посредством трубок, снабженных зажимными элементами, шприц подключен к третьему контейнеру через разветвитель, соединенный со шприцем отдельной трубкой, также снабженной роликовым зажимом, а первый контейнер выполнен из полиолефина без пластификаторов, обеспечивающего высокую гидрофильность внутренней поверхности, предотвращающего адгезивность тромбоцитов на стенке контейнера и способного пропускать кислород и углекислый газ, второй и третий контейнеры выполнены из этиленвинилацетата – материала, устойчивого к замораживанию и хранению при температуре от минус 80°С до минус 196°С.
2. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что первый контейнер выполнен объемом не менее 200 мл.
3. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что второй контейнер выполнен объемом 120-250 мл.
4. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что третий контейнер выполнен объемом до 200 мл.
5. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что шприц использован объемом 10-20 мл.
6. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что шприц выполнен с возможностью автоматизированного дозированного введения КП.
7. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что трубки выполнены из полимерного материала, характеризующегося возможностью высокотемпературного герметичного запаивания.
8. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что количество зажимных элементов составляет четыре, один из которых размещен на трубке, соединяющей первый и второй контейнеры, второй - на трубке между вторым и третьим контейнером, третий между шприцем и третьим контейнером, а четвертый - на трубке у основания второго контейнера.
9. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что в качестве зажимных элементов использованы роликовые зажимы.
10. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что поршень шприца выполнен из полимерного материала.
11. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что первый контейнер имеет размеры Ш/В - 170/240 мм, второй контейнер - 130/285 мм, а третий - 125/150 мм.

## Приложение Б

Патент на полезную модель № 169287

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 169287

**УСТРОЙСТВО ДЛЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ  
ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы "Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы" (RU)*

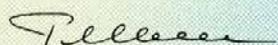
Авторы: *Высочин Игорь Валерьевич (RU), Кобзева Елена Николаевна (RU), Хватов Валерий Борисович (RU)*

Заявка № 2016131819

Приоритет полезной модели 03 августа 2016 г.

Дата государственной регистрации в  
Государственном реестре полезных  
моделей Российской Федерации 14 марта 2017 г.Срок действия исключительного права  
на полезную модель истекает 03 августа 2026 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев

**Формула полезной модели**

(Патент на полезную модель № 169287 «Устройство для криоконсервирования тромбоцитов»)

1. Устройство для КК тромбоцитов, включающее два контейнера, где первый предназначен для хранения плазмы, полученной в процессе фракционирования исходного ТК, а второй – непосредственно для фракционирования ТК с получением КТК и плазмы и последующим хранением КТК, шприц для введения КП, при этом первый контейнер соединен со вторым посредством трубок, снабженных зажимными элементами, шприц подключен ко второму контейнеру через разветвитель, соединенный со шприцом отдельной трубкой, также снабженной роликовым зажимом, оба контейнера выполнены из этиленвинилацетата – материала, устойчивого к замораживанию и хранению при температуре от минус 80°С до минус 196°С.
2. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что первый контейнер выполнен объемом 120-250 мл.
3. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что второй контейнер выполнен объемом до 200 мл.
4. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что шприц использован объемом 10-20 мл.
5. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что шприц выполнен с возможностью автоматизированного дозированного введения КП.
6. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что трубки выполнены из полимерного материала, характеризующегося возможностью высокотемпературного герметичного запаивания.
7. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что количество зажимных элементов составляет два, один из которых размещен на трубке, соединяющей первый и второй контейнеры, второй - между шприцом и вторым контейнером.
8. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что в качестве зажимных элементов использованы роликовые зажимы.
9. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что поршень шприца выполнен из полимерного материала.
10. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что первый контейнер имеет размеры Ш/В - 130/285 мм, а второй - 125/150 мм.

## Приложение В

Патент на полезную модель № 167874

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 167874

**УСТРОЙСТВО ДЛЯ ПОДГОТОВКИ  
КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ К  
ТРАНСФУЗИИ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы "Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы" (RU)*

Авторы: *Высочин Игорь Валерьевич (RU), Кобзева Елена Николаевна (RU), Хватов Валерий Борисович (RU)*

Заявка № 2016131826

Приоритет полезной модели 03 августа 2016 г.

Дата государственной регистрации в

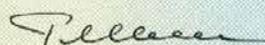
Государственном реестре полезных

моделей Российской Федерации 11 января 2017 г.

Срок действия исключительного права

на полезную модель истекает 03 августа 2026 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ильев

**Формула полезной модели**

(Патент на полезную модель № 167874 «Устройство для подготовки КТК к трансфузии»)

1. Устройство для подготовки КТК к трансфузии, включающее три контейнера, где первый предназначен для хранения РТ, второй - для размещения размороженной плазмы, и третий – для ресуспендирования КТК, регулятор скорости, при этом первый контейнер соединен со вторым, второй контейнер соединен с третьим через регулятор скорости посредством трубок, снабженных зажимными элементами, а первый контейнер выполнен из полиолефина, предотвращающего адгезию тромбоцитов на поверхности контейнера и обеспечивающего пропускание углекислого газа и кислорода, второй и третий контейнеры выполнены из этиленвинилацетата, при этом первый контейнер имеет объем, обеспечивающий свободное размещение и постоянное перемешивание для аэрации РТ, и объем первого контейнера в 2-4 раза больше объема второго контейнера, количество зажимных элементов составляет четыре, один из которых размещен на трубке, соединяющей первый и второй контейнеры, второй - на трубке между вторым контейнером и регулятором скорости, третий между регулятором скорости и третьим контейнером, а четвертый - на трубке у основания второго контейнера.
2. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что первый контейнер выполнен объемом до 1000 мл.
3. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что второй контейнер выполнен объемом 120 - 250 мл.
4. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что третий контейнер выполнен объемом до 250 мл.
5. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что регулятор скорости обеспечивает постоянную скорость в диапазоне от 10 до 250 мл/ч.
6. Устройство по п. 1, характеризующееся тем, что в качестве зажимных элементов использованы роликовые зажимы.

## Приложение Г

Патент на изобретение № 2623081

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2623081

**СПОСОБ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы (RU)*

Авторы: *Высочин Игорь Валерьевич (RU), Макаров Максим Сергеевич (RU), Кобзева Елена Николаевна (RU), Хватов Валерий Борисович (RU)*

Заявка № 2016124196

Приоритет изобретения 20 июня 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 июня 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 июня 2036 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев

**Формула изобретения**

(Патент на изобретение № 2623081 «Способ криоконсервирования тромбоцитов»)

1. Способ КК тромбоцитов, включающий: отбор исходного ТК с концентрацией тромбоцитов от  $1 \times 10^9$ /мл до  $1,5 \times 10^9$ /мл, содержащих от 40% до 70% тромбоцитов с гранулами и тромбоциты с адгезивной активностью от 40% до 70%; разделение ТК на тромбоцитсодержащую часть и плазму с последующим отделением плазмы от тромбоцитсодержащей части; приготовление комбинированного КП, содержащего 55% ДМСО и 5% декстран 40, путем разведения КП плазмой до конечной концентрации ДМСО от 10 до 15 %; ресуспендирование тромбоцитсодержащей части разведенным КП, который вводят в тромбоцитсодержащую часть по 1-3 мл с интервалами 1-3 минуты при постоянном перемешивании до конечной концентрации ДМСО в суспензии тромбоцитов от 5 до 7%; замораживание суспензии тромбоцитов и плазмы со скоростью 1-3<sup>0</sup>/мин в отдельных контейнерах в морозильной камере при температуре от минус 80 до минус 100 °С; хранение замороженных тромбоцитов и плазмы при температуре от минус 85 °С до минус 196 °С; размораживание контейнеров с замороженными тромбоцитами и плазмой нагреванием при температуре от 37 до 40<sup>0</sup>С в течение от 2 до 10 минут; ресуспендирование РТ плазмой, совместимой по системе АВО, в соотношении 1:9, в течение 10 минут; хранение РТ при температуре от 20 до 24<sup>0</sup>С и постоянном перемешивании не более 4 часов до трансфузии.
2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что разделение ТК на тромбоцитсодержащую часть и плазму осуществляют центрифугированием со скоростью от 1100 g до 1400 g в течение от 7 до 12 минут.
3. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве КП используют DIMETYLSULFOXIDE/DEXTRAN 40 SOLUTION (Cryopreservative Solution) 5 ml.
4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что ресуспендируют тромбоцитсодержащую часть КП в течение от 9 до 12 минут.
5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что исходный ТК отбирают объемом от 180 до 220 мл, для приготовления комбинированного КП с конечной концентрации ДМСО от 10 до 15 % исходный КП разводят плазмой в объемном соотношении 1:9, ресуспендирование тромбоцитсодержащей части разведенным КП для получения суспензии тромбоцитов с конечной концентрацией ДМСО от 5 до 7% осуществляют в объемном соотношении 1:1, РТ ресуспендируют добавлением от 172 до 208 мл размороженной плазмы по 20 мл через 1-2 минуты в контейнер с 15-25 мл РТ.
6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что после размораживания измеряют следующие параметры тромбоцитов: количество тромбоцитов, количество тромбоцитов с гранулами и количество адгезивно активных тромбоцитов.
7. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что оценивают качество РТ по следующим параметрам: объем от 180 до 220 мл, сохранность тромбоцитов не менее 75 % от исходного, сохранность тромбоцитов с гранулами и тромбоцитов с адгезивной активностью не менее 50% от исходного.

## Приложение Д

Патент на изобретение № 2623083

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2623083

**СПОСОБ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы (RU)*

Авторы: *Высочин Игорь Валерьевич (RU), Макаров Максим Сергеевич (RU), Кобзева Елена Николаевна (RU), Хватов Валерий Борисович (RU)*

Заявка № 2016124197

Приоритет изобретения 20 июня 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 21 июня 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 июня 2036 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Исаев* Г.П. Исаев

**Формула изобретения**

(Патент на изобретение № 2623083 «Способ замораживания тромбоцитов»)

1. Способ замораживания тромбоцитов включает:
  - отбор исходного ТК с концентрацией тромбоцитов от  $1 \times 10^9$ /мл до  $1,5 \times 10^9$ /мл, содержащего ФАТ;
  - разделение ТК на тромбоцитсодержащую часть и плазму, с последующим отделением плазмы от тромбоцитсодержащей части;
  - приготовление комбинированного КП, содержащего 55% ДМСО и 5% декстран 40, путем разведения КП плазмой до конечной концентрации ДМСО от 10 до 15 %;
  - ресуспендирование тромбоцитсодержащей части разведенным КП, который вводят в тромбоцитсодержащую часть по 1-3 мл с интервалами 1-3 минуты при постоянном перемешивании до конечной концентрации ДМСО в суспензии тромбоцитов от 5 до 7%;
  - замораживание суспензии тромбоцитов и плазмы со скоростью 1-30/мин в отдельных контейнерах в морозильной камере при температуре от минус 80 до минус 100<sup>0</sup>С;
  - хранение замороженных тромбоцитов и плазмы при температуре от минус 85<sup>0</sup>С до минус 196<sup>0</sup>С;
2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что ФАТ в исходном ТК определяются параметрами: тромбоциты с гранулами от 40% до 70% и тромбоциты с адгезивной активностью от 40 до 70%;
3. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что разделение ТК на тромбоцитсодержащую часть и плазму осуществляют центрифугированием со скоростью от 1100 g до 1400 g в течение от 7 до 12 минут.
4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве КП используют DIMETYLSULFOXIDE/DEXTRAN 40 SOLUTION (Cryopreservative Solution) 5 ml.
5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что ресуспендируют тромбоцитсодержащую часть КП в течение от 9 до 12 минут.
6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что исходный ТК отбирают объемом от 180 до 220 мл, для приготовления комбинированного КП с конечной концентрации ДМСО от 10 до 15 % исходный КП разводят плазмой в объемном соотношении 1:9, ресуспендирование тромбоцитсодержащей части разведенным КП для получения суспензии тромбоцитов с конечной концентрацией ДМСО от 5 до 7% осуществляют в объемном соотношении 1:1.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2623864

**СПОСОБ ПОДГОТОВКИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ  
ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ ТРАНСФУЗИИ**

Патентообладатель: *Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы (RU)*

Авторы: *Высочин Игорь Валерьевич (RU), Макаров Максим Сергеевич (RU), Кобзева Елена Николаевна (RU), Хватов Валерий Борисович (RU), Тюрин Игорь Александрович (RU), Клюев Александр Евгеньевич (RU), Стрельникова Татьяна Анатольевна (RU)*

Заявка № 2016124198

Приоритет изобретения 20 июня 2016 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 29 июня 2017 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 20 июня 2036 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев

**Формула изобретения**

(Патент на изобретение № 2623864 «Способ подготовки криоконсервированных тромбоцитов для трансфузии»)

1. Способ подготовки КТК для трансфузии, включающий:
  - размораживание контейнеров, содержащих замороженные тромбоциты, нагреванием при температуре от 37 до 40<sup>0</sup>С в течение от 2 до 4 минут;
  - определение концентрации ДМСО в РТ;
  - определение объема плазмы или ресуспендирующего раствора, необходимого для введения в РТ для получения конечной концентрации ДМСО не более 0,5%, с последующим ресуспендированием РТ данным объемом плазмы, совместимой по системе АВО, или ресуспендирующим раствором при постоянном перемешивании в течение 8-12 минут со скоростью подачи плазмы или раствора 1 – 3 мл в минуту;
  - хранение РТ до трансфузии не более 4 часов при температуре от 20 до 24<sup>0</sup>С и постоянном перемешивании.
2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что концентрацию ДМСО определяют в аликвоте РТ методом газовой хроматографии.
3. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что концентрацию ДМСО в КТК определяют на газовом хроматографе Shimadzu GC-17А с пламенно-ионизационным детектором и автосамплером.
4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что в качестве ресуспендирующего раствора используют SAGM.
5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что ресуспендирование РТ осуществляют при объемных соотношениях плазмы/раствора и РТ от 1:9 до 1:19.
6. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что перед трансфузией РТ конкретному пациенту рассчитывают дозу исходя из его антропометрических характеристик:  $2 \times 10^{11}$  тромбоцитов на 1 м<sup>2</sup> поверхности тела пациента или  $0,7 \times 10^{11}$  тромбоцитов на 10 кг веса пациента.
7. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что после размораживания тромбоцитов оценивают их качество по следующим параметрам: объем от 180 до 220 мл, сохранность тромбоцитов не менее 75 % от исходного, сохранность тромбоцитов с гранулами и тромбоцитов с адгезивной активностью не менее 50% от исходного.
8. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что перед ресуспендированием РТ из контейнера, в котором они хранились в замороженном состоянии, переводят в аэрируемый контейнер из ПВХ с фталатным пластификатором.
9. Способ по п. 8, характеризующийся тем, что для ресуспендирования используют контейнер для получения, транспортировки и хранения тромбоцитов: 994CF-E № ФСЗ 2011/09569, 2011-04-18 от Дельрус (Россия); производитель: Haemonetics Corporation (США).

## Приложение Е

**Уведомление о регистрации лицензионного договора с ГБУЗ ВО ОСПК**

Форма № 501 Д-2016

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
(РОСПАТЕНТ)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993. Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 531-63-18

Наш № 2017Д26154

**УВЕДОМЛЕНИЕ  
о государственной регистрации предоставления права использования по лицензионному  
договору**

Уведомляю о государственной регистрации предоставления права использования изобретений и полезных моделей по лицензионному договору.

- (11) Патенты на изобретения №№2623081, 2623083, 2623864
- (11) Патенты на полезные модели №№169287, 169578, 167874

Имя и адрес лица, предоставляющего право использования -  
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы "Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы"  
129090, Москва, Большая Сухареvская пл., 3

Имя и адрес лица, которому предоставлено право использования -  
Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Владимирской области "Областная станция переливания крови"  
600005, г. Владимир, ул. Студенческая, 5

Номер государственной регистрации: РД0242820

Дата государственной регистрации: 01.02.2018

Заместитель начальника управления  
организации предоставления  
государственных услуг - начальник  
отдела патентного права

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сведения о сертификате ЭП

Сертификат: 04DC104EE49490E580E711C8D982D8F8DC

Владелец: Галковская Виктория Геннадьевна

Срок действия с 05.12.2017 по 05.12.2018

Галковская В.Г.

## Приложение Ж

**Уведомление о регистрации лицензионного договора с ГБУЗ ТО ОСПК**

Форма № 501 Д-2016

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
(РОСПАТЕНТ)**

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993. Телефон (8-499) 240-60-15. Факс (8-495) 531-63-18

Наш № 2017Д26153

**УВЕДОМЛЕНИЕ  
о государственной регистрации предоставления права использования по лицензионному  
договору**

Уведомляю о государственной регистрации предоставления права использования изобретений и полезных моделей по лицензионному договору.

- (11) Патенты на изобретения №№2623081, 2623083, 2623864  
 (11) Патенты на полезные модели №№169287, 169578, 167874

Имя и адрес лица, предоставляющего право использования -  
 Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы "Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы"  
 129090, Москва, Большая Сухаревская пл., 3

Имя и адрес лица, которому предоставлено право использования -  
 Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Тюменской области "Областная станция переливания крови"  
 625023, Тюменская обл., г. Тюмень, ул. Энергетиков, 35

Номер государственной регистрации: РД0242819

Дата государственной регистрации: 01.02.2018

Заместитель начальника управления  
 организации предоставления  
 государственных услуг - начальник  
 отдела патентного права

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сведения о сертификате ЭП

Сертификат: 04DC104EE49490E580E711C8D9B2D8F8DC

Владелец: Галковская Виктория Геннадьевна

Срок действия с 05.12.2017 по 05.12.2018

Галковская В.Г.

## Приложение 3

**Акт о внедрении технологии КК тромбоцитов в ГБУЗ ВО ОСПК**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ  
«ОБЛАСТНАЯ СТАНЦИЯ  
ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ»  
(ГБУЗ ВО ОСПК)

600005, г. Владимир, ул. Студенческая, 5  
тел./факс (4922) 53-71-00  
oblstkrov@clients.vinfo.ru  
ОКПО 01919403, ОГРН 1033302003250  
ИНН/КПП 3328101213/332801001

17 января 2018г. № 24

**Акт о внедрении****Технологии криоконсервирования тромбоцитов**

В рамках лицензионного договора на использование изобретения и полезной модели от 14 декабря 2017 г. ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» передал, а ГБУЗ ВО ОСПК получил запатентованную технологию (патенты: № 2623081, 2623083, 2623864, 169287, 169578, 167874, приоритет от 20 июня 2016 г.) в виде Стандартной операционной процедуры с описанием технологического процесса.

В результате внедрения технологии криоконсервирования тромбоцитов в ГБУЗ ВО ОСПК заготовлено 264 дозы криоконсервированных тромбоцитов; разморожено и перелито больным 135 лечебных доз тромбоцитных концентратов.

Внедрение технологии криоконсервирования тромбоцитов позволило:

- отказаться от списания по сроку годности тромбоцитных концентратов за счет увеличения срока хранения, с 5 суток до 24 месяцев (730 дней);
- не использовать дорогостоящую технологию инактивации патогенов в тромбоцитных концентратах, заменив ее карантинизацией криоконсервированных тромбоцитов;
- выбраковывать после карантинизации замороженные тромбоциты в случае выявления у доноров опасных инфекций (Гепатит В и С, ВИЧ) при повторном обследовании.
- создать стратегический запас тромбоцитных компонентов для ЛПУ Владимирской области в целях планового использования, в праздничные и выходные дни, и на случай ЧС;
- обеспечить индивидуальный подбор тромбоцитных компонентов больным с хирургической или онкогематологической патологией;
- получить положительный клинический эффект при лечении больных с геморрагическим синдромом.

Главный врач ГБУЗ ВО ОСПК



*(Handwritten signature)*

Д.А. Находкин

## Приложение И

**Акт о внедрении технологии КК тромбоцитов в ГБУЗ ТО «ОСПК»**

Департамент здравоохранения  
Тюменской области  
Государственное бюджетное учреждение  
здравоохранения Тюменской области  
"Областная станция переливания крови"  
ГБУЗ ТО «ОСПК»

Энергетиков ул., д. 35, Тюмень, 625023  
Тел./ факс (3452) 28-77-65  
E-mail: Tospk35@yandex.ru  
ОКПО 01948385 ОГРН 1027200846749  
ИНН 7203002479 КПП 720301001

16.01 2018 г. № 0044

**Акт о внедрении****технологии криоконсервирования тромбоцитов**

В рамках лицензионного договора на использование изобретения и полезной модели от 13 декабря 2017 г. ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» передал, а ГБУЗ ТО ОСПК получил запатентованную технологию (патенты: № 2623081, 2623083, 2623864, 169287, 169578, 167874, приоритет от 20 июня 2016 г.) в виде Стандартной операционной процедуры с описанием технологического процесса.

В результате внедрения технологии криоконсервирования тромбоцитов в ГБУЗ ТО ОСПК заготовлено 96 доз криоконсервированных тромбоцитов; разморожено и перелито больным 39 лечебных доз тромбоцитных концентратов.

Внедрение технологии криоконсервирования тромбоцитов позволило:

- отказаться от списания по сроку годности тромбоцитных концентратов за счет увеличения срока хранения, с 5 суток до 24 месяцев (730 дней);
- не использовать дорогостоящую технологию инактивации патогенов в тромбоцитных концентратах, заменив ее карантинизацией криоконсервированных тромбоцитов;
- выбраковывать после карантинизации замороженные тромбоциты в случае выявления у доноров опасных инфекций (гепатит В и С, ВИЧ) при повторном обследовании;

- создать стратегический запас тромбоцитных компонентов для ЛПУ Тюменской области в целях планового использования, в праздничные и выходные дни, и на случай ЧС.

Размороженный тромбоцитный концентрат, заготовленный по данной технологии, соответствует требованиям безопасности и обладает высокой клинической эффективностью, востребован лечебными учреждениями г. Тюмени.

Главный врач ГБУЗ ТО ОСПК



А.В. Гаврилей

## Приложение К

**Справка о внедрении технологии КК тромбоцитов  
в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»**



«УТВЕРЖДАЮ»  
Заместитель директора  
по научной работе  
ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В.  
Склифосовского ДЗМ»,  
д.м.н., профессор  
М.М. Абакумов  
«19» август 2016 г.

**Справка о внедрении**

Технология криоконсервирования тромбоцитов, разработанная врачом-трансфузиологом отделения производственной и клинической трансфузиологии, гравитационной хирургии крови, Высочиным Игорем Валерьевичем, выполнившего диссертационную работу на тему: «Особенности заготовки и криоконсервирования тромбоцитов для клинического применения» - внедрена в практическую работу отделения производственной и клинической трансфузиологии, гравитационной хирургии крови.

За период с 2013 и 2015 гг. было заготовлено 207 доз криоконсервированных тромбоцитов, разморожено и перелито больным 115 доз. Для коррекции тромбоцитопении размороженные тромбоциты переолиты кардиохирургическим больным после операции с использованием АИК, больным после трансплантации органов, больным с массивной кровопотерей после сочетанной травмы.

Внедрение технологии криоконсервирования тромбоцитов позволило: увеличить срок хранения тромбоцитных компонентов; обеспечить инфекционную и иммунологическую безопасность трансфузий; проводить индивидуальный подбор гемокомпонентов; создать стратегический запас тромбоцитных компонентов на случай ЧС; заготавливать и длительно хранить аутологичные гемокомпоненты больных, находящихся в листе ожидания для трансплантации органов.

Зав. отделением производственной  
и клинической трансфузиологии,  
гравитационной хирургии крови, к.м.н.

 - Е.Н. Кобзева

врач-трансфузиолог отделения производственной  
и клинической трансфузиологии, гравитационной  
хирургии крови

 - Б.А. Сорокин

врач-трансфузиолог отделения производственной  
и клинической трансфузиологии, гравитационной  
хирургии крови

 - А.В. Серых