

*На правах рукописи*

**ВЫСОЧИН ИГОРЬ ВАЛЕРЬЕВИЧ**

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

**14.01.21 – гематология и переливание крови**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва – 2019**

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Хватов Валерий Борисович**

**Официальные оппоненты:**

**Трахтман Павел Евгеньевич** - доктор медицинских наук, заведующий отделением трансфузиологии, заготовки и процессинга стволовых клеток федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Купряшов Алексей Анатольевич** - доктор медицинских наук, заведующий отделением переливания крови федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 208.135.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125167, г. Москва, Новый Зыковский пр-д, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и на сайте [www.blood.ru](http://www.blood.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

**Сысоева Елена Павловна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

В диссертационной работе поставлена актуальная научная задача, состоящая в разработке способа заготовки и эффективной технологии криоконсервирования тромбоцитов на основе их морфофункциональной активности.

### **Актуальность исследования**

Тромбоцитные компоненты интенсивно используют для лечения больных в трансплантологии, кардиохирургии, реаниматологии, гепатологии, гематологии, акушерстве и гинекологии, в педиатрии и неонатологии, хирургии, травматологии [Савченко В.Г. и соавт., 2016; Жибурт Е.Б. и соавт., 2013; Рагимов А.А. и соавт., 2018; Dumont L.J. et al., 2013; Bohonek, M. et al., 2016; Holley A. Et al., 2013]. В последние два десятилетия наблюдается устойчивый рост потребности в тромбоцитных концентратах (ТК), как в Российской Федерации [Губанова М.Н. и соавт., 2017; Четкин А.В. и соавт., 2018], так и за рубежом [Dumont L.J. et al., 2013; Bohonek, M. et al., 2016; Holley A. Et al., 2013]. Трансфузии ТК позволяют останавливать кровотечение у пациентов с тромбоцитопенией и тромбоцитопатией, способствуют разработке и совершенствованию интенсивных лечебных программ во многих областях медицины [Рагимов А.А. и соавт., 2018]. 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 [Сидоров С.К. и соавт., 2017]. 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 [Dijkstra-Tiekstra M.J. et al., 2003; Dumont L.J. et al., 2013]. В результате сохранность ФАТ в КТК в среднем составляет лишь 30-33% от исходной концентрации [Gerber B. et al., 2016], доля неэффективных трансфузий КТК нередко превышает 50% [Slichter S.J. et al., 2014]. 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. 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 до сих пор не было предложено адекватной методики оценки качества тромбоцитов до и после КК. Широко распространено использование подходов, разработанных R.Valeri с соавт. 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

Впервые показано распределение доноров крови и ТК по содержанию ФАТ. Выявлены 3 популяции доноров: основная (58% доноров) с концентрацией ФАТ от 45 до 60% (основная группа), популяция с невысоким содержанием ФАТ (от 35 до 44%), и популяция с высоким содержанием ФАТ (от 61 до 75%). ТК имеют аналогичное распределение по концентрации ФАТ. В процессе хранения ТК при температуре от 20 до 24 °С и непрерывном помешивании содержание ФАТ значительно 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.).
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; Акт о внедрении технологии КК тромбоцитов от 17 января 2018 г. № 24).
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»; Акт о внедрении технологии КК тромбоцитов от 16 января 2018 г. № 0017).
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 диссертаци-

ционным исследованием. Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на 22 отечественных и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах: Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2011 г., устный доклад); X научно-практическая конференция «Внутрибольничные инфекции в стационарах различного профиля, профилактика, лечение осложнений» (Москва, 2012 г., устный доклад); VI научно-практическая конференция «Современная гематология. Проблемы и решения» (Москва, 2012 г., устный доклад); VI научно-практическая конференция «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ» (Москва, 2013 г., устный доклад); 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); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2014 г., устный доклад); XIV съезд Федерации анестезиологов и реаниматологов (Казань, 2014 г., устный доклад); Первая Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2015 г. устный доклад); II ЕВРАЗИЙСКИЙ КОНГРЕСС «Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства крови» (Санкт-Петербург, 2016 г., устный доклад); 34-й Международный Конгресс Международного общества переливания крови (Дубаи, 2016 г., стендовый доклад); 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); IV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» (Санкт-Петербург, 2016 г., устный доклад); II Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2016 г., устный доклад); Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы трансфузиологии» (Хабаровск, 2017 г., устный доклад); Санибель Симпозиум общества перфузиологов США (Форт-Майерс, США, 2017 г., устный доклад); VII БЕЛОМОРСКИЙ СИМПОЗИУМ (Архангельск, 2017 г., устный доклад); Съезд Американской ассоциации банков крови (Сан-Диего, 2017 г., стендовый доклад); III Московская конференция специалистов производственной и клинической трансфузиологии (Москва, 2017 г., устный доклад); III ЕВРАЗИЙСКИЙ КОНГРЕСС «Актуальные вопросы развития безвозмездного донорства крови» (Астана, 2018 г., устный доклад); 35-й Международный Конгресс Международного общества переливания крови (Торонто, 2018 г., стендовый доклад); Съезд Американской ассоциации банков крови (Бостон, 2018 г., стендовый доклад); 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».

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

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 со сроком хранения до 5 суток при температуре от +20 до +24 °С и постоянном перемешивании 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.).

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). Криоконсервирование полученных ТК проводили в течение первых суток с момента заготовки. Криоконсервировали ТК с комбинированным стерильным криопротектором – раствором для криохранения клеточного и биологического материалов в жидком азоте «Раствор CryoSure-DEX40 (55 г/дл диметилсульфоксид, 5 г/дл декстран 40)» способом, разработанным в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». Полученные КТК хранили в морозильном ларе при температуре минус 85<sup>0</sup>С, а также в жидком азоте при температуре минус 196<sup>0</sup>С не более 24 месяцев. Карантин с КТК снимали после повторного обследования доноров на наличие вирусов: ВИЧ, Гепатит В и С – через 180 суток после заготовки крови. Размораживали КТК при 37<sup>0</sup>С на приборе Varkey Plasmatherm. После размораживания КТК готовили к трансфузии с помощью устройства защищенного патентом RU 167874 U1.

Качество аферзных ТК и КТК оценивали по: объему, содержанию тромбоцитов, лейкоцитов, рН. Дополнительно определяли остаточное количество эритроцитов. Осмолярность КТК измеряли на приборе Osmomat 030. Количество ДМСО в КТК определяли на газовом хроматографе Shimadzu GC-17A (Япония) с пламенно-ионизационным детектором и автосамплером. Для оценки содержания ФАТ использовали оригинальный метод, основанный на окрашивании клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями на основе триафлавина и акридинового оранжевого с последующим анализом тромбоцитов во флуоресцентном микроскопе (Патент РФ на изобретение № 2485502). Количество ФАТ определяли в ТК и КТК, а также в крови больных до и после трансфузии ТК и КТК. Нормальное содержание ФАТ в крови здорового человека составляет от 30 до 70%; при содержании менее 30% - возникает риск кровотечения на фоне гипоагрегации тромбоцитов.

На 3-м этапе исследовали клиническую эффективность 90 доз ТК, полученных методом афереза, и 230 доз КТК, заготовленных по разработанной методике. Лечебные и профилактические трансфузии ТК и КТК проводили больным для коррекции тромбоцитопении и геморрагического синдрома. Трансфузии ТК и КТК проводили пациентам обоего пола, в возрасте от 17 до 87 лет после трансплантации легких, печени, почки, протезирования аорты и при др. Критериями включения пациентов в исследование были: тромбоцитопения потребления, в сочетании с выраженным геморрагическим синдромом или клинически значимой интраоперационной кровопотерей. В соответствии с нормативной документацией трансфузии ТК и КТК проводили с учетом совместимости донора и реципиента по системе АВО и резус-фактору. Дополнительно всем пациентам, вошедшим в исследование с 2014 г по 2016, проводили тест на иммунологическую совместимость с ТК и КТК. Для оценки индивидуальной совместимости использовали аппарат Immucor NEO и Реагент Capture-P<sup>®</sup>.

Кроме того, провели сравнительный анализ качества тромбоцитов в крови 143 пациентов, которым переливали КТК (основная группы) и ТК (контрольная группы) для коррекции клеточного гемостаза. Кроме того, у 132 пациентов проводили тест на иммунологическую совместимость с ТК и КТК. 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). Эффективность трансфузии ТК и КТК оценивали клинически и рассчитывали СПТ и СП ФАТ с учетом антропометрических данных реципиента, а также дозы ТК и КТК. Трансфузию ТК и КТК считали эффективной при СПТ через 1 и 24 часа более 7500/мкл и 4500/мкл соответственно. При расчете стоимости трансфузионной 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 включает также и стоимость исследования на совместимость. В расчетную стоимость не включали стоимость самого ТК или КТК, индивидуально подбираемого для пациента. Полученные данные обработаны 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. Рассчитывали медиану и оценивали различие СПТ у больных разных групп после трансфузии ТК и КТК по U-критерию Манна-Уитни.

## Результаты

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

Для получения ТК, используемых в клинической практике, общепринятым является отбор доноров, исходя из количества тромбоцитов в их крови. Анализ частоты встречаемости количества тромбоцитов в крови у 1000 обследованных доноров показал «нормальное распределение». 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 (180-360  $\times 10^9/\text{л}$ ), составляя в среднем  $258 \pm 21 \times 10^9/\text{л}$ . 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. 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 сходным с тем, что наблюдается в крови доноров и составляло в среднем  $52,0 \pm 6,2\%$ . Таким образом, процедура тромбоцитафереза значимо не влияло на каче-

ство 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. Дополнительные исследования гендерных отличий доноров не выявили существенных отличий по общей концентрации тромбоцитов в крови и ТК между донорами-мужчинами и донорами-женщинами. Однако, общая концентрация ФАТ у доноров-женщин была достоверно выше как в крови, так и в ТК по сравнению с донорами-мужчинами. Анализ качества тромбоцитов в процессе хранения тромбоцитных концентратов показал, что общая концентрация тромбоцитов и рН в ТК в процессе 5 суток хранения значительно не изменились. Количество тромбоцитов в ТК варьировало от 250 до  $270 \times 10^9/\text{дозе}$ , а рН – в пределах от 7,1 до 7,3, что соответствовало норме. 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 уровень ФАТ не превышал 1-2%. 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 в течение всего срока наблюдения. Эти данные позволяют заключить, что выявление аннексин V-положительных тромбоцитов не позволяет адекватно оценить качество клеток ТК. Уровень CD62P-положительных тромбоцитов напрямую не коррелирует с параметром ФАТ, и практически не меняется в течение 2 суток хранения, хотя содержание ФАТ достоверно изменялось уже через 1 сутки хранения. Таким образом, определение ФАТ представляется наиболее чувствительной для оценки качества тромбоцитов в процессе хранения. Таким образом, выявлена высокая неоднородность по качеству тромбоцитов как у доноров крови, так и в ТК. Качество тромбоцитов не зависит от их общей концентрации в крови и ТК, однако может значительно изменяться в процессе хранения при температуре от  $+20$  до  $+24^{\circ}\text{C}$  и непрерывном помешивании. С учетом того, что уровень ФАТ начинает резко снижаться после 2 суток, ТК 3 и более суток хранения представляются уже менее предпочтительными. Предложенный интегральный параметр ФАТ представляется эффективным для оценки качества ТК, как исходных, так и после различных воздействий. Поэтому данный параметр будет использован для анализа качества тромбоцитов в процессе КК, а также для оценки эффективности трансфузии КТК и ТК.

## **2. Обоснования 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 тромбоцитсодержащую часть и бесклеточную плазму осуществляли путем центрифугирования ТК с ускорением 1250g. 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 в течение 8-12 мин. Конечная концентрация ДМСО в суспензии тромбоцитов варьировала от 5 до 6%. После введения КП тромбоцитсодержащую часть ТК замораживали при минус 80°С. КТК и бесклеточную плазму хранили в морозильной камере при температуре минус 85°С или в жидком азоте при температуре минус 196°С в течение 100-900 суток. После разморозки КТК разведение тромбоцитов осуществляли с помощью бесклеточной плазмы из того же ТК. Объем размороженной плазмы составлял 90-120 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°С и непрерывном помешивании. В КТК, КК по предложенной технологии, содержание ФАТ заметно не менялось в течение 4 часов. Таким образом, предложенная методика КК тромбоцитов позволяет иметь запас времени до трансфузии размороженных клеток.

Разработана автоматизированная технология КК тромбоцитов с использованием современного оборудования и расходных материалов, зарегистрированных в РФ (патенты на изобретения №: 2623081, 2623083, 2623864). Для повышения качества получаемых КТК разработано два устройства, представляющие собой асептические закрытые системы, позволяющие проводить обработку ТК во время КК не нарушая герметичности (патент на полезную модель № 169578, № 169287). Высокие производственные 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. Оформлены акты о внедрении технологии КК тромбоцитов. В результате внедрения технологии КК тромбоцитов в ГБУЗ ВО ОСПК и в ГБУЗ ТО ОСПК по состоянию на январь 2018 гг. заготовлено 264 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. 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 технологии 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.

### **3. 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. В этой связи проведена оценка качества тромбоцитов ТК после хранения при температуре от +20 до +24<sup>0</sup>С и последующего КК клеток. 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 значимо различалась. ТК в день афереза и ТК через 1-и сутки хранения в среднем давали весьма высокий уровень сохранности 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%. 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 x10<sup>9</sup>/дозе, относительное содержание ФАТ – 50-75%, общее содержание ФАТ – 100-180 x10<sup>9</sup>/дозе. В таких ТК сохранность ФАТ варьировала от 40 до

70%, составляя в среднем  $52 \pm 4\%$ . Таким образом, наиболее предпочтительными для КК являются ТК, содержащие 50-75% ФАТ.

#### **4. Оценка клинической эффективности тромбоцитных концентратов**

Трансфузии тромбоцитных компонентов проводятся у пациентов с выраженной тромбоцитопенией или тромбоцитопатией, чтобы, с одной стороны, скорректировать клинически выраженный ГС, а с другой – улучшить 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 и после трансфузии ТК.

Для коррекции тромбоцитопении и ГС обследованным больным проведены трансфузии лечебных доз ТК. 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 возросла 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.

Стоит особо подчеркнуть, что при всех успешных трансфузиях уровень 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) уровень ФАТ у пациентов в 67% случаев был ниже 10%. У всех пациентов, которым потребовались повторные трансфузии, уровень ФАТ в крови также были 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. 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. Коррекция 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 уровень ФАТ в крови после трансфузии КТК был достоверно выше, чем после трансфузий ТК 3-4 суток – 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. Эффективность КТК отчетливо видна на примере пациентов с кардиохирургической патологией. 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.

Таким образом, морфофункциональный анализ тромбоцитов показал, что КТК, полученные по разработанной методике, дают такой же эффект, что и ТК. Необходимо особо подчеркнуть, что высокий уровень клинической эффективности (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. Определение концентрации ФАТ в крови пациентов до и после трансфузии подтвердила эффективность КТК, наблюдаемую клинически (коррекция ГС). Разработанная методика КТК позволяет проводить длительное хранение и карантинизацию тромбоцитных компонентов без значительной потери их функциональной активности.

## **6. Карантинизация криоконсервированных тромбоцитов для обеспечения инфекционной безопасности гемоконпонентной терапии**

ТК ограничено 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 гемоконпонентов, задержанных по Гепатиту В и С, ВИЧ. В связи с этим производство КТК является наиболее предпочтительным в связи с возможностью карантинизации и обеспечения инфекционной безопасности трансфузии тромбоцитных компонентов. Карантинизацию КТК проводили по аналогии с СЗП в соответствии с принятыми НД в РФ. За период с 2013 по 2017 год было карантинизировано более 600 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.

## **7. 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 тромбоцитов, содержащихся в ТК и КТК, с сывороткой реципиентов также наблюдали не у всех больных. Только для 38 (68%) больных проведены трансфузии ТК и КТК, которые были индивидуально совместимы. Из них у 21(55%) больного АТА не были выявлены, а у остальных 17 (45%) реципиентов АТА были

определены. Терапевтический эффект (снижение интенсивности кровотечения или темпа геморрагического отделяемого по дренажам, 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 трансфузии ТК и КТК больным не выявлено посттрансфузионных реакций и осложнений. 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=17). После трансфузии КТК 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. Значимое отличие и наибольший СПТ и СП ФАТ сохранялся 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 коррекции кровотечения, по сравнению с трансфузией несовместимых КТК, которое потребовало повторное переливание. После окончания трансфузии КТК повторные трансфузии тромбоцитных компонентов практически не требовались больным ранее получивших трансфузии совместимых КТК. Напротив, у больных, получивших 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 свежезамороженной плазмы (в среднем 2,8 дозы), чем у больных после несовместимой трансфузии КТК - ЭСК (в среднем 3,8 дозы) и свежезамороженной плазмы (в среднем 8,3 дозы). При трансфузии ТК, по совместимости тромбоцитов и наличию АТА, было сформировано только две 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. Наблюдали значимое отличие и наибольший СПТ и СП ФАТ, как после трансфузии ТК, также как после трансфузии КТК, 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 коррекции кровотечения, по сравнению с трансфузией несовместимых ТК, после которого требовалось повторное переливание. После окончания трансфузии КТК повторные трансфузии тромбоцитных компонентов практически не требовались больным ранее получивших трансфузию совместимый 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. 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. Показана высокая клиническая эффективность ТК и КТК с целью коррекции ГС, обусловленного выраженной тромбоцитопенией. Исходя из полученных данных, следует, что КТК, заготовленные по разработанной методике в ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», 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 до 24 месяцев и обеспечить достаточное количество КТК для индивидуального подбора не только по АВО, но и антигенам системы Резус – D, C, c, E, e – а также HLA и HPA. 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 хирургического профиля Института, а также: управлять запасами ТК (сроки хранения, антигенное разнообразие); регулировать потоки доноров; карантинизировать тромбоциты, что исключает риск трансмиссии инфекции и достойная альтернатива ИП; переливать как клеточные, так и плазменные компоненты полученные от одного донора одному реципиенту; 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.

### **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 °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 до-

статочных стратегических запасов, доступных для больных круглосуточно, независимо от производства ТК. Идеальная модель обеспечения безопасными тромбоцитными гемоконпонентами – 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  $27 \times 10^9$ /л, а через 24 часа –  $23 \times 10^9$ /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 АВО, Резус-фактор, а также антигенами лейкоци-

тов человека и антигенами тромбоцитов человека значительно повышает клиническую эффективность тромбоцитных концентратов и криоконсервированных тромбоцитов; снижает потребность в эритроцитсодержащих компонентах и свежезамороженной плазме и стоимость гемокомпонентной терапии.

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Криоконсервирование и длительное хранение эритроцитов и тромбоцитов // Трансфузиология: нац. руководство / под ред. А.А. Рагимова. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – Гл. 13. - С. 215 [Материалы представлены в электронном приложении]. - (Серия «Национальные руководства»).
2. Криоконсервирование 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.
3. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике [Текст] / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, В.Б. Хватов // Медицинский алфавит. - 2012. - № 2.-Вып. Современная лаборатория.-2012.-№ 3.-С.32-34.
4. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания [Текст] / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, Н.В. Боровкова, В.Б. Хватов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013.- Т. 156, № 9. – С. 388-391.
5. Заготовка и клиническое применение криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров, А.С. Глухов, И.А. Тюрин, А.Е. Ключев, В.Б. Хватов // Альманах клинической медицины. – 2014. - № 30. – С. 70-75.
6. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения [Текст] / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, Н.В. Боровкова, В.Б. Хватов // Альманах клинической медицины. – 2014. - № 30. – С. 83-87.
7. Производство и клиническое применение криоконсервированных тромбоцитов и тромбоцитных концентратов [Текст] / М.Ш. Хубутия, И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров, И.А. Тюрин, А.Е. Ключев, Т.А. Стрельникова, В.Б. Хватов // Вестник службы крови России. – 2015. - № 3. – С. 45-51.
8. Анализ морфофункционального статуса тромбоцитов у доноров разных групп: портрет «идеального донора» тромбоцитных компонентов / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин [Текст] // Трансфузиология. – 2016. – Т. 17, № 2. - С.14-26.

9. Биологическая полноценность и клиническая эффективность криоконсервированных тромбоцитов человека / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин [Текст] // Молодой ученый. -2016. - №2 (106). - С. 357-360.
10. Клинико-экономическое обоснование оценки индивидуальной совместимости криоконсервированных тромбоцитов и тромбоцитных концентратов перед трансфузией реципиентам [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров, В.Б. Хватов, А.И. Костин, А.В. Серых, А.А. Аристакесян, Е.А. Роганова // Трансфузиология. – 2016.– Т. 17, № 3. - С.57-74.
11. Анализ морфофункционального статуса тромбоцитов человека в работе лечебно-профилактических учреждений: значение и перспективы [Текст] / М.С. Макаров, Н.В. Боркова, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин // Поликлиника. – 2017. - № 1 (3). – С. 6-9.
12. Пат. на полезную модель 167874 Российская Федерация, МПК<sup>51</sup> А61М 1/38 (2006.01) Устройство для подготовки криоконсервированных тромбоцитов к трансфузии / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – 2016131826; заявл. 03.08.2016; опубл. 11.01.2017, Бюл. № 2.-10с.
13. Пат. на полезную модель 169287 Российская Федерация, МПК<sup>51</sup> А61М 1/38 (2006.01) Устройство для криоконсервирования тромбоцитов / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – 2016131819; заявл. 03.08.2016; опубл. 11.01.2017, Бюл. № 8.-9с.
14. Пат. на полезную модель 169578 Российская Федерация, МПК<sup>51</sup> А01N 1/02 (2006.01) А61J 1/05 (2006.01).- Устройство для криоконсервирования тромбоцитов / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – 2016131824; заявл. 03.08.2016; опубл. 23.03.2017, Бюл. № 9.-9с.
15. Пат. 2623081 Российская Федерация, МПК<sup>51</sup> А01N 1/02 (2006.01) Способ криоконсервирования тромбоцитов / И.В. Высочин, М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – № 2016124196; заявл. 20.06.2016; опубл. 21.06.2017, Бюл. № 18. - 15с.
16. Пат. 2623083 Российская Федерация, МПК<sup>51</sup> А01N 1/02 (2006.01) Способ замораживания тромбоцитов / И.В. Высочин, М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов; заявитель и

патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – № 2016124197; заявл. 20.06.2016; опубл. 21.06.2017, Бюл. № 18. - 14с.

17. Пат. 2623864 Российская Федерация, МПК<sup>К 51</sup> А01N 1/02 (2006.01) Способ подготовки криоконсервированных тромбоцитов для трансфузии / И.В. Высочин, М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов, И.А. Тюрин, А.Е. Ключев, Т.А. Стрельникова; заявитель и патентообладатель Государственное учреждение здравоохранения Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения. – № 2016124198; заявл. 20.06.2016; опубл. 29.06.2017, Бюл. №19. - 14с.

18. Контроль качества криоконсервированных тромбоцитов [Текст] / И.В. Высочин, М.И. Лазаренко, Е.Н. Кобзева, Е.Е. Биткова, Н.Ю. Бугарь [Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф.] // Трансфузиология. -2011.- №2.- С.49-50.

19. Карантинизация криоконсервированных эритроцитов – новый этап в обеспечении безопасности переливания компонентов донорской крови [Текст] / В.Б. Хватов, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, А.С. Глухов // Внутрибольничные инфекции в стационарах различного профиля, профилактика, лечение осложнений: прогр., тез. докл. X науч.-практ. конф. (г. Москва, 5-6 апр. 2012 г.). - М.,2012. - С.65.

20. Эффективность и безопасность применения криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // Современная гематология. Проблемы и решения: тез. докл. VI науч.-практ. конф., (г. Москва 1-2 ноября 2012 г.). - М., 2012.- С. 13-14.

21. Методика газохроматографического определения диметилсульфоксида и возможности применения ее в медицине [Текст] / И.А. Тюрин, А.Е. Ключев, И.В. Высочин // Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ: тез. докл. VI науч.-практ. конф., (г. Москва, 23-24 мая 2013г.). - М., 2013.-С.42-43.

22. Адгезивная активность тромбоцитов пациентов с тромбозами бедренных артерий в разных отделах сосудистого русла [Текст] / М.С. Макаров, А.Г. Ларин, Л.С. Коков, И.В. Высочин, Н.В. Боровкова, В.Б. Хватов [Материалы докл. II конгр. гематологов России, (г. Москва, 17-19 апр. 2014 г.)] // Гематология и трансфузиология. - 2014.- Прил. № 1. - С. 103.

23. Карантинизация криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов – основа безопасной гемотрансфузии [Текст] / М.Ш. Хубутя, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин // [Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии: тезисы докл. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч.]// Трансфузиология. – 2014. – Т.15, № 2. – С. 108-109.

24. Клиническая эффективность и безопасность криоконсервированных тромбоцитов [Текст] / М.Ш. Хубутя, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров, И.В. Высочин // Тезисы XIV съезда Федерации анестезиологов и реаниматологов, (г. Казань, 20-22 сент. 2014 г.). - Казань, 2014. - С. 337-338.
25. Морфофункциональный анализ тромбоцитов доноров в процессе хранения [Текст] / И.В. Высочин, М.С. Макаров, В.Б. Хватов, Е.Н. Кобзева, Н.В. Боровкова // 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.
26. Технология получения и клиническое применение карантинизированных клеточных компонентов [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, А.С. Глухов, 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. 16.
27. Биологическая полноценность и клиническая эффективность криоконсервированных тромбоцитов человека [Текст] / М.С. Макаров, И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // Достижения современной науки – медицине Подмоскovie: междисциплинар. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов, (г. Москва, 17 ноября 2015г.). - М., 2015.- С. 24-25.
28. Использование криоконсервированных тромбоцитов для коррекции гемостаза у кардиохирургических больных [Текст] / М.Ш. Хубутя, И.В. Высочин, В.В. Соколов, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров // Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии: тезисы докл. VII всерос. конф. с междунар. уч., (г. Москва, 29-31 января 2015 г.). – М., 2015.– С. 447-448.
29. Влияние технологии инактивации патогенов на качество клеток тромбоцитных концентратов [Текст] / И.В. Высочин, М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева // Вестник гематологии. – 2016. –Т.12, №4: [Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови: тезисы докл. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч., г. Санкт-Петербург, 20–21 октября 2016 г.]. –С.32-33.
30. Значимость анализа морфофункционального статуса тромбоцитов человека для клинической и производственной практики [Текст] / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, В.Б. Хватов, И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - №9: Второй Рос. конгресс лабораторной медицины. Дни лабораторной медицины России-2016: материалы науч.-практ. междисциплинар. конф. с междунар. участием, г. Москва, 12-14 октября. - С. 585.

31. Организация обеспечения безопасными гемокомпонентами НИИ Скорой помощи им. Н.В. Склифосовского планово и в условиях чрезвычайных ситуаций [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов // Оказание скорой и неотложной медицинской помощи раненым и пострадавшим при массовом поступлении: материалы Всерос. конф., 3-го съезда врачей неотложной медицины, (г. Москва, 6-7 октября 2016г.). - М.: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2016. - (Труды ин-та, Т.237). - С. 15-16.
32. Аппаратная технология криоконсервирования тромбоцитов [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, В.Б. Хватов // Трансфузиология: тез. докл. III Моск. конф. специалистов производств. и клин. трансфузиологии и 25 конф. Моск. о-ва гемафереза, (г. Москва, 16-18 нояб. 2017г.).- М., 2017.-С. 21-23.
33. Опыт применения криоконсервированных тромбоцитов [Текст] / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // 7-й Беломорский симпозиум: сб. тез. докл. Всерос. конф. с междунар. участием, (г. Архангельск, 22-23 июня 2017г.). -Архангельск, 2017. - С. 76-77.
34. Экспресс-метод морфофункционального анализа тромбоцитов, пригодных для клинического использования [Текст] / М.С. Макаров, В.Б. Хватов, Е.Н. Кобзева, Н.В. Боровкова, И.В. Высочин // Лабораторная служба. - 2017. - №3: Тез. докл. III Рос. конгр. лабораторной медицины, (г. Москва, 11-13 окт. 2017 г.). - С. 165.
35. Automated Platelet Cryopreservation Technique [Text] / I.V. Vysochin, M.S. Khubutiya, E.N. Kobzeva // Transfusion. – 2017. – Vol.57, Suppl. 3: Abstract Presentations from the AABB Annual Meeting, (San Diego, CA, 7-10 oct. 2017). – P.80A. – Abstr.CP35.
36. Correction of Thrombocytopenia in Post-Cardiac Surgery Patients with Transfusion of Cryopreserved Platelets [Text] / I.V. Vysochin // The Sanibel Symposium, (April 5-8, 2017, Fort Myers, Florida). – P. 51-53.