

Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)

Система стандартизации
в здравоохранении Российской Федерации
Группа 18. Требования к продуктам крови, трансплантатам

**КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ
И ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ХРАНЕНИЕ
ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ
В УЧРЕЖДЕНИЯХ СЛУЖБЫ КРОВИ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 35-2019

Санкт-Петербург
2019

Криоконсервирование эритроцитов при умеренно низких температурах и пролонгированное хранение после размораживания в учреждениях службы крови: Методические рекомендации / А. В. Четкин, С. С. Бессмельцев, С. Д. Волкова, Г. Ю. Кирьянова, Г. В. Гришина.— СПб., ФМБА России, 2020.— Агентство «ВиТ-принт», 2020.— 24 с.

Методические рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России).

*В настоящем руководстве реализованы требования
Федеральных законов Российской Федерации
от 20 июля 2012 №125-ФЗ «О донорстве крови и ее компонентов»
и от 21 ноября 2011 №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья
граждан в Российской Федерации».*

*Утверждены заместителем руководителя
Федерального медико-биологического агентства Ю. В. Мирошниковой
13.08.2019 г.*

Рецензенты: Доктор медицинских наук, профессор *Сидоркевич С. В.*
Доктор медицинских наук, профессор *Ганапиев А. А.*

Введены впервые.

Область применения

1. Методические рекомендации распространяются на проблемы усовершенствования технологии безаппаратного криоконсервирования эритроцитов с целью повышения безопасности и обеспечения возможности транспортировки важного компонента донорской крови — эритроцитной взвеси, размороженной и отмытой.
2. Настоящий документ устанавливает, что криоконсервированные при температуре -40°C с использованием 20 % конечной концентрации глицерина эритроциты после размораживания могут храниться при температуре $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ как в криозащитном растворе до момента отмывания (в течение 7 дней) — метод отсроченного отмывания эритроцитов, так и в ресуспендирующих растворах после отмывания — метод создания «закрытой» системы криоконсервирования.
3. Методические рекомендации предназначены для учреждений ФМБА России и могут применяться в деятельности специалистов службы крови, осуществляющих заготовку, переработку, хранение и обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов.

© Коллектив авторов, 2020

© ООО «Агентство “ВиТ-принт”», 2020

ВВЕДЕНИЕ

В практической трансфузиологии криоконсервирование эритроцитов является единственным способом длительной сохранности красных клеток крови в состоянии анабиоза с последующим восстановлением их функциональной активности после декриоконсервирования. Метод замораживания незаменим для организации банков фенотипированных, аутологичных, редких групп эритроцитов, проведения их карантинизации с целью профилактики гемотрансмиссивных инфекций, создания запасов серонегативных по ЦМВ эритроцитов для особых групп реципиентов, накопления нескольких доз от одного донора для осуществления принципа «один донор — один реципиент», а также обеспечения стратегических запасов [1, 2].

В последние десятилетия основное внимание ученых было уделено проблеме продления сроков хранения декриоконсервированных эритроцитов за счет создания закрытых систем замораживания-отмывания [3, 4] и разработки добавочных растворов, при использовании которых происходит стабилизация мембраны размороженных клеток за счет непроникающих добавок (сахарозы, маннита, белков, полимеров) и поддержание их функциональной полноценности за счет проникающих метаболитов углеводно-фосфатного обмена (глюкозы, фосфатов, аденина) [5–7]. Итогом исследований явилось продление гипотермического хранения декриоконсервированных эритроцитов с 24-х часов (при использовании «открытых» методов) до 5–21 суток — при использовании «закрытых систем» и аппаратного метода, а также современных добавочных растворов (в основном, в эксперименте).

В то же время, ограниченный срок хранения декриоконсервированных эритроцитов, возникающие при определенных ситуациях потребности в транспортировке, а также случаи отмены заявки или отсутствие возможности отмывания уже размороженных эритроцитов, явились поводом для изучения целесообразности их хранения в криозащитном растворе до момента необходимой трансфузии [8].

В Российском НИИ гематологии и трансфузиологии в процессе разработки нового метода криоконсервирования эритроцитов при температуре -38 ± 2 °С под защитой низкой концентрации глицерина [9] в пилотных исследованиях была изучена возможность хранения размороженных эритроцитов в криозащитном растворе до отмывания. Было показано, что глицерин в конечной концентрации 15–20% не оказывает повреждающего действия на нативные эритроциты даже при продолжительном их хранении в гипотермических условиях [10]. Полученные результаты явились основанием для более углубленного изучения целесообразности

хранения размороженных эритроцитов в криозащитном растворе, ингредиенты которого способны оказывать тормозящее влияние на процессы клеточного метаболизма. В результате проведенных исследований было доказано, что отсрочено отмытые после гипотермического хранения в растворе криопротектора в течение 7 суток эритроциты не только не уступают, а по ряду параметров даже превосходят красные клетки, отмытые непосредственно после размораживания. Это свидетельствует о том, что разнесение во времени (на 7 суток или любой более короткий срок) двух «стрессовых» для криоконсервированных клеток процедур — оттаивание и отмывание — оказывает положительное влияние на их сохранность [11]. Следовательно, методика отсроченного отмывания эритроцитов, криоконсервированных при -40°C , позволит решить важную задачу временного хранения при $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ размороженных эритроцитов для транспортировки в лечебные учреждения, находящиеся на значительном расстоянии от учреждения службы крови и имеющие условия для отмывания размороженных эритроцитов, а также оптимизировать управление запасами этого стратегически важного компонента крови и снизить трудозатраты. Например, возможно провести размораживание эритроцитов в конце рабочего дня, а отмывание — на следующий день или через несколько суток.

Кроме того, в ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России продолжены исследования по выбору оптимального режима безаппаратного криоконсервирования эритроцитов при использовании новых полимерных систем (с растворами) и изучена возможность их модификации с целью обеспечения герметичности на этапах замораживания, отмывания и ресуспендирования [12]. Было предложено усовершенствование в виде замены короткой трубки (служащей для заливки растворов) на удлиненную (12 см) эластичную, стандартного диаметра трубку, подходящую для стерильного соединения с соответствующими магистралями контейнера с эритроцитами и контейнера для отмывания, с использованием аппарата для стерильного соединения. В этом случае соединение эритроцитов с криоконсервантом, а в дальнейшем с отмывающими и ресуспендирующими растворами происходят в замкнутой («закрытой») системе. Получен патент на полезную модель № 180533 от 15.06.2018 г. и осуществлен выпуск опытной партии изделий, которые были использованы для изучения возможности хранения ОРЭ в ресуспендирующих растворах, в том числе — экспериментальных. Была доказана эффективность раствора «Ресин» (ЦНИИГПК 8в) для хранения отмытых размороженных эритроцитов в течение 3-х суток.

1. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

Настоящий документ разработан на основании рекомендаций и требований следующих нормативных правовых актов и нормативных документов:

- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 28 марта 2012 г. № 278н «Об утверждении требований к организациям здравоохранения (структурным подразделениям), осуществляющим заготовку, переработку, хранение и обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов, и перечня оборудования для их оснащения».
- Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 2 апреля 2013 г. № 183н «Об утверждении правил клинического использования донорской крови и (или) ее компонентов».
- Инструкция по криоконсервированию клеток крови (Утв. Минздравом РФ 29.05.1995).
- Метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах со сниженной концентрацией глицерина (Методические рекомендации, утвержденные Минздравом РСФСР 05.02.1990).
- ГОСТ Р 52938-2008 Кровь донорская и ее компоненты. Контейнеры с консервированной кровью или ее компонентами. Маркировка.
- ГОСТ Р 53420-2009 Кровь донорская и ее компоненты. Общие требования к обеспечению качества при заготовке, переработке, хранении и использовании донорской крови и ее компонентов.
- ГОСТ 31597-2012 Контейнеры полимерные для крови и ее компонентов однократного применения. Технические требования. Методы испытаний.

Примечание. При пользовании настоящим документом целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящей методикой следует руководствоваться заменяющим (измененным) документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Деглицеринизация — это поэтапное отмывание размороженных эритроцитов от криозащитного раствора на основе глицерина;

Добавочный (ресуспендирующий) раствор — это раствор, состав которого разработан специально для поддержания функциональных свойств клеточных компонентов во время хранения;

Криоконсервированные эритроциты — это компонент донорской крови человека, полученный из цельной крови, в котором эритроциты заморожены с использованием криопротектора и хранятся при отрицательной температуре; требуют последующего размораживания и отмывания;

Полимерный контейнер — это емкость однократного использования, применяемая для заготовки донорской крови и ее компонентов, разделения донорской крови на компоненты, последующего хранения и клинического использования.

3. ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- АТФ** — аденозинтрифосфорная кислота;
- ОНЭ** — осмотически неустойчивые эритроциты;
- ОРЭ** — отмытые размороженные эритроциты;
- ООРЭ** — отсрочено отмытые размороженные эритроциты;
- ОПК** — отделение переливания крови;
- СПК** — станция переливания крови;
- ЦМВ** — цитомегаловирус;
- ЭМ** — эритроцитная масса;
- Hb** — гемоглобин;
- MCV** — средний объем эритроцитов (mean corpuscular volume);
- p50** — напряжение кислорода крови при ее 50% насыщении, отражающее сродство гемоглобина к кислороду.

ОСНОВНЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

4.1. Методы криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах, обеспечивающие их пролонгированное хранение после размораживания

Методические рекомендации посвящены новой технологии криоконсервирования эритроцитов в учреждениях службы крови (СПК, ОПК, имеющих криобанки эритроцитов). Используя 40 % глицерин в основе криоконсервирующего раствора и умеренно низкую температуру замораживания (-40°C), показана возможность пролонгированного хранения размороженных эритроцитов в криозащитном растворе без отмывания в течение от 1 дня до 7 суток при $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ без потери их морфофункциональной полноценности. Технология создает благоприятные условия для транспортировки данного стратегически важного компонента крови, в случае необходимости, на значительные расстояния, а также позволяет оптимизировать приготовление отмывых размороженных эритроцитов в учреждениях Службы крови.

Качество размороженных эритроцитов, хранившихся в гипотермических условиях в криозащитном растворе, подтверждено данными лабораторных исследований.

Кроме того, использование «закрытой» системы криоконсервирования-декриоконсервирования эритроцитов (патент на полезную модель № 180533 от 15.06.2018) позволяет хранить уже готовые к переливанию отмывые размороженные эритроциты в различных ресуспендирующих растворах (срок хранения зависит от состава раствора).

4.2. Медицинское оборудование

Для получения криоконсервированных эритроцитов необходимо оборудование:

- весы медицинские (для взвешивания крови и ее компонентов);
- плазмоекстрактор (автоматический или механический (ручной));
- устройство для запаивания трубок полимерных контейнеров для заготовки и хранения крови стационарное;
- центрифуга рефрижераторная напольная;
- холодильник медицинский (температура ниже -25°C), 500 л;
- холодильник медицинский (температура $+2 - +6^{\circ}\text{C}$), 500 л;

- аппарат для размораживания и подогрева компонентов крови;
- устройство для стерильного соединения полимерных трубок;
- термоконтeйнер для транспортировки крови и ее компонентов.

4.3. Расходные материалы

Для получения криоконсервированных эритроцитов необходимы следующие расходные материалы:

- комплект изделий для криоконсервирования эритроцитов однократного применения, стерильный, включающий контейнер с криоконсервантом Криосин (глицерол — 400 мл; маннит — 40,0 г; натрия хлорид — 7,0 г, натрия фосфат двузамещенный — 0,3 г, вода для инъекций до 1000 мл);
- комплект изделий для отмывания и ресуспендирования криоконсервированных эритроцитов однократного применения, стерильный, включающий контейнер полимерный для отмывания и ресуспендирования криоконсервированных эритроцитов, а также контейнеры с отмывающими растворами: Маннисин № 1 (маннит — 160 г, натрия хлорид — 7 г, вода для инъекций до 1000 мл); Маннисин № 2 (маннит — 50 г, натрия хлорид — 7 г, вода для инъекций до 1000 мл); Маннисин № 3 (маннит — 25 г, натрия хлорид — 7 г, вода для инъекций до 1000 мл) и ресуспендирующим раствором Ресин (сахароза — 70 г; хлорид натрия — 3 г, гидрофосфат натрия — 2 г, дигидрофосфат натрия — 1 г, вода для инъекций до 1000 мл).
- набор расходных материалов для устройства для стерильного соединения полимерных трубок.

5. МЕТОД КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ПРИ -40°С С ОТСРОЧЕННЫМ ОТМЫВАНИЕМ ЭРИТРОЦИТОВ

Разработанная методика отсроченного отмывания криоконсервированных при -40°C эритроцитов с использованием 40% глицерина обеспечивает возможность их пролонгированного хранения при положительной температуре (4°C) до 7 суток. Сущность методики сводится к проведению процедуры деглицеринизации не сразу после размораживания эритроцитов, а непосредственно перед их переливанием после хранения при 4°C в криозащитном растворе. Соблюдение лишь этого условия без каких-либо материальных затрат, использования сложных и дорогих ресуспендирующих растворов, а также отсутствие необходимости разгерметизации емкости со взвесью эритроцитов непосредственно после оттаивания обеспечивает существенное увеличение максимально допустимого срока их хранения, что упрощает реализацию размороженных эритроцитов и дает возможность их транспортировки на значительные расстояния.

5.1. Порядок проведения метода

Методика отсроченного отмывания размороженных эритроцитов является неотъемлемой частью метода криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах, который предусматривает следующие этапы:

1. Глицеринизация эритроцитов;
2. Замораживание и низкотемпературное хранение;
3. Оттаивание взвеси замороженных эритроцитов;
4. Хранение взвеси размороженных эритроцитов в криозащитном растворе при 4°C ;
5. Деглицеринизация (отмывание) эритроцитов;
6. Ресуспендирование отмывтых эритроцитов.

5.1.1. Глицеринизация эритроцитов

Замораживанию подвергается эритроцитная масса (от 125 до 250 мл), полученная из консервированной донорской крови после ее центрифугирования при 2000 g, температуре 4°C в течение 20 минут, хранившаяся не более 3-х суток. В случае использования эритроцитной взвеси, ее предварительно необходимо подвергнуть центрифугирова-

нию и снятию супернатанта. ЭМ и криозащитный раствор должны быть комнатной температуры. В процессе глицеринизации к эритроцитам медленно, с использованием магистрала с роликовым зажимом, при тщательном перемешивании добавляется раствор «Криосин» (с 40% содержанием глицерина) до соотношения 1 : 1 (с экспозициями в течение 8–10 минут после добавления 1/5, 1/3 и оставшейся части криозащитного раствора). Эквилибрационный период перед помещением контейнера в холодильник должен быть 40–60 минут.

5.1.2. Замораживание и низкотемпературное хранение

Подготовленную к замораживанию эритроцитную взвесь в контейнере объемом 750 мл паспортизируют и в горизонтальном положении помещают в медицинский холодильник (-40°C), где осуществляется ее нерегулируемое медленное замораживание и последующее хранение в течение не более 1 года.

5.1.3. Оттаивание взвеси замороженных эритроцитов

Оттаивание эритроцитов осуществляют на аппарате для размораживания и подогрева крови и ее компонентов. Контейнер с замороженной эритроцитной взвесью помещается на поворотную пластину аппарата этикеткой вниз, магистралями вверх. Размораживание проводится в течение различного времени (в зависимости от объема взвеси) до комнатной температуры. В процессе размораживания рекомендуется каждые 5 минут перемешивать взвесь в контейнере.

5.1.4. Хранение взвеси размороженных эритроцитов в криозащитном растворе при 4°C

Контейнер с размороженной эритроцитной взвесью выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа и помещают в медицинский холодильник ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) для хранения или в термоконтейнер для транспортировки крови и ее компонентов ($4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) для доставки эритроцитов в медицинские организации с целью их клинического использования после отмывания. Оптимальный срок хранения — до 7 суток. Для оптимизации работы медицинских работников возможно провести размораживание эритроцитов в конце рабочего дня, а отмывание — на следующий день или через несколько суток.

5.1.5. Деглицеринизация (отмывание) эритроцитов

I этап

Размороженную эритроцитную взвесь, хранившуюся при 4°C, переводят в контейнер для отмывания эритроцитов и адаптируют к комнатной температуре (при замораживании целой дозы эритроцитов взвесь предварительно центрифугируют и большую часть супернатанта удаляют). С помощью магистрали с пластиковой иглой контейнер соединяют с емкостью, содержащей отмывающий раствор Маннисин № 1, и медленно, постоянно перемешивая, добавляют весь его объем к взвеси эритроцитов (в соотношении не менее чем 1 : 1). Не разъединяя (используя зажим), контейнеры центрифугируют при 1250 g, температуре 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переводят в контейнер из-под раствора Маннисин № 1. Использованную трубку контейнера для отмывания герметизируют.

II этап

С помощью второй магистрали с пластиковой иглой контейнер для отмывания соединяют с емкостью, содержащей отмывающий раствор Маннисин № 2, и медленно, постоянно перемешивая, добавляют весь его объем к эритроцитам (в соотношении не менее чем 1 : 1). Не разъединяя (используя зажим), контейнеры центрифугируют в том же режиме. Надосадочную жидкость переводят в контейнер из-под раствора Маннисин № 2. Использованную трубку контейнера для отмывания герметизируют.

III этап

С помощью третьей магистрали с пластиковой иглой контейнер для отмывания соединяют с емкостью, содержащей отмывающий раствор Маннисин № 3, и медленно, постоянно перемешивая, добавляют весь его объем к эритроцитам (в соотношении не менее чем 1 : 1). Не разъединяя (используя зажим), контейнеры центрифугируют при 1250 g, температуре 4°C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость переводят в контейнер из-под раствора Маннисин № 3. Использованную трубку контейнера для отмывания герметизируют.

5.1.6. Ресуспендирование отмывтых эритроцитов

С помощью четвертой магистрали с пластиковой иглой контейнер для отмывания соединяют с емкостью, содержащей ресуспендирующий раствор Ресин. Последний добавляют к деглицеринизированным

эритроцитам строго в соотношении 1:1, тщательно перемешивают. Контейнер с отмытыми размороженными эритроцитами в растворе Ресин герметизируют и паспортизируют. Эритроциты готовы к клиническому применению в течение 24-х часов с момента ресуспендирования.

5.2. Эффективность метода отсроченного отмывания

При изучении 20 образцов размороженных эритроцитов, отмытых непосредственно после оттаивания, и отсрочено отмытых через 1 неделю хранения при 4°C (по ½ дозы) установлено, что по таким показателям, как содержание свободного гемоглобина, количеству осмотически неустойчивых эритроцитов, проценту гемолиза, морфологическому индексу, MCV, р50, содержанию гемоглобина в дозе разница между взвесями отсрочено отмытых и отмытых в день разморозки эритроцитов не является статистически значимой. Так, содержание ОНЭ во взвесах отсрочено отмытых размороженных эритроцитов (ООРЭ) составило $0,9 \pm 0,17\%$ против $1,4 \pm 0,29\%$ в отмытых сразу после оттаивания; процент гемолиза равнялся $0,09 \pm 0,029$ и $0,12 \pm 0,037$, р50— $29,7 \pm 1,08$ и $36,4 \pm 1,09$ соответственно. Содержание АТФ во взвесах отмытых размороженных эритроцитов (ОРЭ), хранившихся при температуре -40°C, соответствует $5,78 \pm 0,28$ мкмоль/г Hb, в отсрочено отмытых через 1 неделю эритроцитах этот показатель составил $5,45 \pm 0,31$ мкмоль/г Hb. Содержание в дозе ООРЭ гемоглобина составляло $46,6 \pm 1,22$ г (в ОРЭ — $45,2 \pm 1,28$ г), процент сохраненных клеток — $82,0 \pm 1,55$ (в ОРЭ — $78,9 \pm 2,74\%$). Следовательно, отсрочено отмытые после гипотермического (при 4°C) хранения в растворе криопротектора в течение 1 недели эритроциты не уступали компонентам крови, отмытым непосредственно после размораживания и соответствовали требованиям стандартов качества. При осуществлении отсроченного отмывания через 2 недели (по ½ дозы) показатели сохранности морфофункциональных свойств эритроцитов также статистически достоверно не отличались от таковых ОРЭ: содержание гемоглобина в перерасчете на целую дозу составило $43,4 \pm 1,38$ г против $43,6 \pm 1,84$; процент сохраненных клеток $83,5 \pm 2,80$ против $83,1 \pm 3,50$; р50— $42,9 \pm 3,08$ и $35,9 \pm 2,18$ мм рт. ст. ($p < 0,1$). По содержанию остаточных лейкоцитов разница между отсрочено отмытыми и отмытыми в день размораживания эритроцитами, как и в случае отсроченного отмывания через 1 неделю, была статистически значима — $0,12 \pm 0,018 \times 10^9/\text{л}$ в ООРЭ и $0,61 \pm 0,065 \times 10^9/\text{л}$ в ОРЭ ($p < 0,01$), что делает данный компонент крови иммунологически более безопасным (в случае, если для криоконсервирования используется нефильтрованная ЭМ).

6. МЕТОД СОЗДАНИЯ «ЗАКРЫТОЙ» СИСТЕМЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ-ДЕКРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ

Используемый в настоящее время безаппаратный (ручной) метод криоконсервирования эритроцитов предусматривает применение растворов (криозащитного, отмывающих, ресуспендирующего), помещенных в контейнеры, и контейнера для отмывания эритроцитов, имеющего магистрали с пластиковыми иглами для соединения со штуцерами контейнеров с эритроцитами и растворами. Основной опасностью на всех стадиях криоконсервирования является возможная бактериальная контаминация эритроцитов, особенно в момент прокалывания штуцера иглой. Поэтому отмывые размороженные эритроциты, полученные таким методом, хранятся не более 24-х часов.

В ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России разработана модификация изделий для криоконсервирования, отмывания и ресуспендирования криоконсервированных эритроцитов однократного применения, стерильных, приводящая к созданию полностью закрытой системы на всех этапах ручного криоконсервирования эритроцитов.

Указанный результат достигается тем, что в контейнерах для вспомогательных растворов со штуцером, имеющаяся короткая, плотная, неэластичная трубка с заглушкой, предназначенная для заполнения контейнера раствором, заменяется на удлиненную эластичную полимерную трубку длиной 12 см. Эта трубка служит как для заполнения раствором, так и для соединения с рабочими контейнерами с помощью устройства для стерильного соединения магистралей.

6.1. Порядок проведения метода

Метод создания «закрытой» системы криоконсервирования-декриоконсервирования эритроцитов предусматривает те же этапы, что и стандартный ручной метод криоконсервирования.

6.1.1. Глицеринизация эритроцитов

Замораживанию подвергается эритроцитная масса (от 125 до 250 мл), полученная из консервированной донорской крови после ее центрифугирования при 2000 g, температуре 4°C в течение 20 минут, хранившаяся не более 3-х суток. В случае использования эритроцитной

взвеси, ее предварительно необходимо подвергнуть центрифугированию и снятию супернатанта. ЭМ и криозащитный раствор должны быть комнатной температуры. Трубка контейнера с ЭМ стерильно соединяется с трубкой контейнера с раствором «Криосин» с помощью устройства для стерильного соединения магистралей. В процессе глицеринизации к эритроцитам медленно, при тщательном перемешивании добавляется раствор «Криосин» до соотношения 1:1 (с экспозициями в течение 8–10 минут после добавления 1/5, 1/3 и оставшейся части криозащитного раствора). Конец трубки запаивается на расстоянии 10 см. Эквilibрационный период перед помещением контейнера в холодильник должен быть 40–60 минут.

6.1.2. Замораживание и низкотемпературное хранение

Подготовленную к замораживанию эритроцитную взвесь в контейнере объемом 750 мл паспортизируют и в горизонтальном положении помещают в медицинский холодильник (-40°C), где осуществляется ее нерегулируемое медленное замораживание и последующее хранение в течение не более 1 года.

6.1.3. Оттаивание взвеси замороженных эритроцитов

Оттаивание эритроцитов осуществляют на аппарате для размораживания и подогрева крови и ее компонентов. Контейнер с замороженной эритроцитной взвесью помещается на поворотную пластину аппарата этикеткой вниз, магистралями вверх. Размораживание проводится в течение различного времени (в зависимости от объема взвеси) до комнатной температуры. В процессе размораживания рекомендуется каждые 5 минут перемешивать взвесь в контейнере.

6.1.4. Деглицеринизация (отмывание) эритроцитов

I этап

Размороженную эритроцитную взвесь, хранившуюся при 4°C, стерильно (с помощью аппарата для стерильного соединения полимерных трубок) переводят в контейнер для отмывания эритроцитов и адаптируют к комнатной температуре (при замораживании целой дозы эритроцитов взвесь предварительно центрифугируют и большую часть супернатанта удаляют в контейнер из-под взвеси). Одну из магистралей

контейнера для отмывания соединяют с емкостью, содержащей отмывающий раствор Маннисин № 1 с помощью аппарата для стерильного соединения полимерных трубок, и медленно, постоянно перемешивая, добавляют весь его объем к взвеси эритроцитов (в соотношении не менее чем 1 : 1). Не разъединяя (используя зажим), контейнеры центрифугируют при 1250g, 4°C в течение 10 минут. Надсадочную жидкость переводят в контейнер из-под раствора Маннисин № 1. Использованную трубку контейнера для отмывания герметизируют.

II этап

Вторую магистраль контейнера для отмывания с помощью аппарата для стерильного соединения подсоединяют к емкости, содержащей отмывающий раствор Маннисин № 2, и медленно, постоянно перемешивая, добавляют весь его объем к эритроцитам (в соотношении не менее чем 1 : 1). Не разъединяя (используя зажим), контейнеры центрифугируют в том же режиме. Надсадочную жидкость переводят в контейнер из-под раствора Маннисин № 2. Использованную трубку контейнера для отмывания герметизируют.

III этап

Третью магистраль контейнера для отмывания стерильно (с помощью аппарата для стерильного соединения полимерных трубок) соединяют с емкостью, содержащей отмывающий раствор Маннисин № 3, и медленно, постоянно перемешивая, добавляют весь его объем к эритроцитам (в соотношении не менее чем 1 : 1). Не разъединяя (используя зажим), контейнеры центрифугируют при 1250 g, 4°C в течение 10 минут. Надсадочную жидкость переводят в контейнер из-под раствора Маннисин № 3. Использованную трубку контейнера для отмывания герметизируют.

6.1.5. Ресуспендирование отмывтых эритроцитов

С помощью четвертой магистрали и аппарата для стерильного соединения контейнер для отмывания соединяют с емкостью, содержащей ресуспендирующий раствор Ресин. Последний добавляют к деглицеринизированным эритроцитам строго в соотношении 1 : 1, тщательно перемешивают. Контейнер с отмывтыми размороженными эритроцитами в растворе Ресин герметизируют и паспортизируют. Эритроциты могут храниться в растворе Ресин до клинического применения в течение 3-х суток при $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

6.2. Эффективность метода

Оценка эритроцитов, полученных с помощью «закрытой» системы криоконсервирования в растворе, Ресин (ЦНИИГПК 8в), показала их полное соответствие установленным стандартам качества.

Взвеси отмытых размороженных эритроцитов, хранившиеся в течение 3-х суток при $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в растворе Ресин, содержали $0,31 \pm 0,040$ г/л свободного гемоглобина; $3,9 \pm 1,64\%$ осмотически неустойчивых клеток; $5,2 \pm 0,24$ ммоль/л внеклеточного калия (что не достигает его уровня в нативной эритроцитной массе 2-х суток хранения); процент гемолиза составил $0,12 \pm 0,015$, $p50-33,6 \pm 1,23$ mm Hg. Уровень АТФ ($3,9 \pm 0,11$ мкмоль/г Hb) является допустимым для трансфузии (составил 82% от его содержания в исходной эритромассе). Следовательно, эритроциты по всем изученным показателям остаются пригодными для клинического использования и после 3-х суток гипотермического хранения, несмотря на отсутствие в растворе «Ресин» таких важных для метаболизма клеток веществ, как аденин и глюкоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, технология криоконсервирования эритроцитов при умеренно низкой температуре (-40°C) с использованием в основе криозащитного раствора 40 % глицерина включает в себя два принципиально новых метода.

Во-первых, метод отсроченного отмывания, который позволит решить важную задачу временного хранения (до 7 суток) размороженных эритроцитов при положительной температуре для оперативной доставки в лечебные учреждения. Сущность метода сводится к проведению процедуры деглицеринизации не сразу после размораживания эритроцитов, а непосредственно перед их переливанием после хранения при $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в криозащитном растворе. Соблюдение лишь этого условия без каких-либо материальных затрат, использования сложных добавочных растворов, а также без необходимости разгерметизации емкости со взвесью эритроцитов после оттаивания приводит к увеличению максимально допустимого срока их хранения. Это обеспечивает возможность их транспортировки (в термоконтейнерах при $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) на значительные расстояния в медицинские организации с целью клинического использования после отмывания.

Также метод позволяет оптимизировать работу медицинского персонала при проведении процедур размораживания и отмывания эритроцитов за счет возможности разнести во времени эти этапы, без потери качества готовой к переливанию взвеси. Возможно, к примеру, провести размораживание эритроцитов в конце рабочего дня, а отмывание — на следующий день или через несколько суток. Соответствие размороженных эритроцитов, хранившихся в гипотермических условиях в криозащитном растворе, установленным стандартам качества (после отмывания и взвешивания в ресуспендирующем растворе) подтверждено данными лабораторных исследований. В параллельных экспериментах (на эритроцитах одного донора) показано, что отсрочено отмывые после гипотермического (при 4°C) хранения в растворе криопротектора в течение 1 недели эритроциты не только не уступали компонентам крови, отмывым непосредственно после размораживания, но по отдельным показателям превосходили их.

Второй новый метод, включенный в технологию, — метод создания «закрытой» системы криоконсервирования-декриоконсервирования эритроцитов — обеспечивает возможность продления срока хранения уже отмывых размороженных эритроцитов. Используемый в настоящее время безаппаратный метод криоконсервирования эритроцитов предусматривает применение растворов (криозащитного, отмываю-

щих, ресуспендирующего), помещенных в контейнеры, и контейнера для отмывания эритроцитов, имеющего магистрали с пластиковыми иглами для соединения со штуцерами контейнеров с эритроцитами и растворами. Основной опасностью на всех стадиях криоконсервирования является возможная бактериальная контаминация эритроцитов, особенно в момент прокалывания штуцера иглой. Поэтому отмывые размороженные эритроциты, полученные таким методом, хранятся не более 24-х часов.

Разработанная авторами модификация изделий для криоконсервирования, отмывания и ресуспендирования — замена короткой трубки на удлиненную, подходящую для стерильного соединения с соответствующими трубками контейнеров с эритроцитами (см. 6.1.1) и контейнером для отмывания (см. 6.1.4 и 6.1.5) — обеспечит соблюдение условий стерильности на всех этапах. Это позволит продлить срок хранения отмывых размороженных эритроцитов с 24-х часов до 3-х суток при использовании раствора «Ресин» (входящего в комплект для отмывания и ресуспендирования криоконсервированных эритроцитов) и более длительно — при использовании эффективных добавочных растворов, содержащих глюкозу и аденин.

Взвеси отмывых размороженных эритроцитов, хранившиеся в течение 3-х суток при $4 \pm 2^\circ\text{C}$ в растворе Ресин, полностью соответствуют установленным стандартам качества.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Алгоритм обеспечения ЦМВ-негативными гемокомпонентами больных группы риска / С. Д. Волкова, В. Н. Чеботкевич, Г. Ю. Кирьянова и др. // Трансфузиология. — 2015. — Т. 16, № 1. — С. 24–35.
2. Опыт разработки новых технологий для службы крови России / Г. Ю. Кирьянова, С. Д. Волкова, Г. В. Гришина и др. // Журнал Medline.ru. — 2013. — Т. 14, № 4 — С. 845–860.
3. Altered processing of thawed red cells to improve the in vitro quality during postthaw storage at 4 degrees C / J. W. Lagerberg, R. Truijens-de Lange, D. de Korte et al. // Transfusion. — 2007. — Vol. 47, № 12. — P. 2242–2249.
4. Lelkens C., Korte D., Lagerberg J. W. Prolonged post-thaw shelf life of red cells frozen without prefreeze removal of excess glycerol // Vox Sang. — 2015. — Vol. 108, № 3. — P. 219–225.
5. Metabolomics of ADSOL (AS-1) red blood cell storage / J. D. Roback, C. D. Josephson, E. K. Waller et al. // Transfus. Med. Rev. — 2014. — Vol. 28, № 2. — P. 41–55.
6. Bandarenko N., Cancelas J., Snyder E. L. Successful in vivo recovery and extended storage of additive solution AS-5 red blood cells after deglycerolization and resuspension in AS-3 for 15 days with an automated closed system // Transfusion. — 2007. — Vol. 47, № 4. — P. 680–686.
7. A multicenter study of in vitro and in vivo values in human RBCs frozen with 40-percent (wt/vol) glycerol and stored after deglycerolization for 15 days at 4°C in AS-3; assessment of RBC processing in the ACP 215 / C. R. Valery, G. Ragno, L. E. Pivacek et al. // Transfusion. — 2001. — Vol. 41, № 7. — P. 933–939.
8. Консервирующее действие глицерина и 1,2-пропандиола при гипотермическом хранении эритроцитов / М. М. Лоевский, А. М. Воротилин, А. М. Белоус и др. // Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1987. — № 7. — С. 128.
9. Метод криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах со сниженной концентрацией глицерина // Методич. реком. — Л. — 1990. — 16 с.
10. Мельникова В. Н., Замалетдинова Т. В., Кирьянова Г. Ю. Пролонгированное хранение при температуре +4°C криоконсервированных и размороженных эритроцитов // Гематология и трансфузиология. — 1995. — Т. 40, № 3. — С. 29–32.

11. Пролонгированное хранение при 4°C размороженных красных клеток крови в криозащитном растворе до отмывания / Г. Ю. Кирьянова, С. Д. Волкова, Г. В. Гришина и др. // Трансфузиология. — 2017. — Т. 18, № 4. — С. 18–29.
12. Криоконсервирование эритроцитов при температурах –40°C и –80°C / Кирьянова Г. Ю., Волкова С. Д., Касьянов А. Д. и др. // Вестник МАХ. — 2017. — № 1. — С. 72–78.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1. Нормативные ссылки	5
2. Термины и определения	6
3. Обозначения и сокращения.....	7
Основные нормативные положения.....	8
4. Общие положения	8
4.1. Методы криоконсервирования эритроцитов при умеренно низких температурах, обеспечивающие их пролонгированное хранение после размораживания.....	8
4.2. Медицинское оборудование	8
4.3. Расходные материалы.....	9
5. Метод криоконсервирования при -40°C с отсроченным отмыванием эритроцитов	10
5.1. Порядок проведения метода	10
5.1.1. Глицеринизация эритроцитов	10
5.1.2. Замораживание и низкотемпературное хранение	11
5.1.3. Оттаивание взвеси замороженных эритроцитов	11
5.1.4. Хранение взвеси размороженных эритроцитов в криозащитном растворе при 4°C	11
5.1.5. Деглицеринизация (отмывание) эритроцитов	12
5.1.6. Ресуспендирование отмывтых эритроцитов.....	12
5.2. Эффективность метода отсроченного отмывания	13
6. Метод создания «закрытой» системы криоконсервирования-декриоконсервирования эритроцитов.....	14
6.1. Порядок проведения метода	14
6.1.1. Глицеринизация эритроцитов	14
6.1.2. Замораживание и низкотемпературное хранение	15
6.1.3. Оттаивание взвеси замороженных эритроцитов	15

6.1.4. Деглицеринизация (отмывание) эритроцитов	15
6.1.5. Ресуспендирование отмытых эритроцитов	16
6.2. Эффективность метода.....	17
Заключение	18
Библиография	20

Методические рекомендации

**КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ
ПРИ УМЕРЕННО НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ
И ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ХРАНЕНИЕ
ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ
В УЧРЕЖДЕНИЯХ СЛУЖБЫ КРОВИ**

Технический редактор: *Кронберг Т. В.*
Компьютерная верстка: *Дмитриева О. С.*

Бумага офсетная «Светокопи». Печать офсетная.
Гарнитура «Calibri». Подписано в печать 13.01.2020 г.
Печ. л. 1,5. Формат 60×90 ¹/₁₆.
Тираж 500 экз. Заказ № 3.

Отпечатано в типографии ООО «Агентство “ВиТ-принт”».
191167, Санкт-Петербург, наб. Обводного канала, д. 23, лит. «Б».
Тел.: (812) 612-40-92, 612-40-93
E-mail: vit-print@mail.ru