

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

На правах рукописи

АБРАМОВСКИЙ СТАНИСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ

ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТА
ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ЕГО ЗАГОТОВКЕ, ХРАНЕНИИ И
ТРАНСПОРТИРОВКЕ

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

3.1.28. Гематология и переливание крови

Научный руководитель:
Сидоркевич Сергей Владимирович
доктор медицинских наук

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ.....	14
1.1 Клиническое значение и актуальные технологии заготовки концентрата тромбоцитов.....	14
1.2 Современные методы переработки концентрата тромбоцитов.....	20
1.2.1 Виды добавочных растворов и роль ресуспендирования при хранении тромбоцитов.....	22
1.3 Влияние добавочных растворов и различных температурных режимов хранения концентрата тромбоцитов на метаболизм, морфологию, гемостатическую функцию и провоспалительный потенциал тромбоцитов ..	25
1.3.1 Стандартное хранение тромбоцитов при температуре +20 - 24°C ...	25
1.3.2 Холодовое хранение тромбоцитов	27
1.3.3 Методика криоконсервирования тромбоцитов.....	35
1.4 Методы определения и маркеры оценки метаболизма и функциональной активности тромбоцитов в процессе хранения.....	37
1.4.1 Лабораторная оценка степени активации и агрегационной способности тромбоцитов.....	40
1.4.2 Современные представления о функциональном потенциале, активации и апоптозе тромбоцитов	41
1.5 Методы транспортировки концентрата тромбоцитов в медицинские организации	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 Технология холодового хранения тромбоцитов в плазме и добавочном растворе SSP+.....	49

2.2	Технология холодового хранения тромбоцитов в экспериментальном добавочном растворе, содержащем фумарат натрия, и растворе SSP+	50
2.3	Методика комбинированного хранения концентрата тромбоцитов	52
2.4	Определение ДНК-содержащих структур в концентратах тромбоцитов	54
2.5	Математическая обработка результатов исследования.....	56
ГЛАВА 3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ В ПЛАЗМЕ И ДОБАВОЧНОМ РАСТВОРЕ SSP+		
3.1		
3.1	Оценка показателей тромбограммы при холодовом хранении КТ в плазме и добавочном растворе	58
3.2	Оценка метаболической активности тромбоцитов в плазме и добавочном растворе	60
3.3	Морфология тромбоцитов при холодовом хранении в плазме и добавочном растворе	63
ГЛАВА 4. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ В ДОБАВОЧНОМ РАСТВОРЕ, СОДЕРЖАЩЕМ ФУМАРАТ НАТРИЯ, И РАСТВОРЕ SSP+		
4.1		
4.1	Оценка показателей тромбограммы КТ в добавочном растворе с фумаратом натрия и в растворе SSP+	68
4.2	Метаболическая активность тромбоцитов в разных добавочных растворах	71
4.3	Гемостатический потенциал тромбоцитов.....	74
4.4	Оценка активационной способности и апоптоза тромбоцитов.....	76
4.5	Морфология тромбоцитов при использовании добавочного раствора с фумаратом натрия и в растворе SSP+	77
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ		
80		

5.1 Моделирование варианта транспортировки КТ совместно с эритроцитной взвесью	80
5.2 Оценка показателей КТ при комбинированном хранении	81
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА УРОВНЯ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР В КОНЦЕНТРАТАХ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ХРАНЕНИЯ	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	102
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	104
ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В условиях увеличивающегося количества онкологических заболеваний, хирургической активности, тенденций в развитии медицины в виде применения высокотехнологичных методов лечения, возникновения чрезвычайных ситуаций, отмечается увеличение потребности в концентрате тромбоцитов (КТ), своевременная обеспеченность которым может определять результат оказания медицинской помощи [11; 33; 35].

В то же время, основными организационными и клиническими вызовами при использовании КТ являются: необходимость максимально минимизировать риск передачи гемотрансмиссивных инфекций, в том числе бактериальных; снижение вероятности HLA-аллоиммунизации (HLA – human leukocyte antigen, человеческий лейкоцитарный антиген), направленной на профилактику развития иммунологических осложнений и формирования рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов; обеспечение достаточного снабжения медицинских учреждений, принимая во внимание ограниченный срок хранения КТ [23].

Вышеуказанные трудности могут быть нивелированы за счёт повышения качественных и количественных характеристик КТ, что достигается совершенствованием технологии заготовки, переработки, хранения и транспортировки КТ, которые на текущий момент включают более тщательную селекцию доноров крови, автоматизацию процесса цитафереза и оптимизацию программного обеспечения сепараторов клеток крови, лейкоредукцию, патогенредукцию, использование добавочных растворов, рентгеновского или γ -облучения [1; 26; 66; 73; 79].

Снижение риска HLA-аллоиммунизации и профилактика трансфузионно-ассоциированной реакции «трансплантат против хозяина» (ТА-РТПХ), особенно

у иммунокомпрометированных больных, в большинстве случаев стало возможно, благодаря современным методам переработки и мультикомпонентной заготовке компонентов донорской крови [32; 37; 110].

Помимо иммунологической толерантности важно уделять внимание аспектам инфекционной безопасности и сохранения высокого качества КТ, что достигается рациональным хранением и выполнением условий транспортировки. Согласно общепринятым представлениям, тромбоциты должны храниться в инкубаторе при температуре от +20°C до +24°C в газопроницаемых мешках с постоянным перемешиванием для предотвращения агрегации и сохранения их жизнеспособности путём поддержания соответствующего газообмена [24; 150]. В вышеуказанных условиях срок хранения тромбоцитов ограничен 5-7 сутками для минимизации рисков, связанных со снижением качества гемокомпонентов, которое происходит во время хранения.

В настоящее время исследуются альтернативные методы хранения компонентов крови, такие как холодовое хранение (при температуре от +2°C до +6°C) и криоконсервация, чтобы устранить недостатки стандартных условий. К ним относятся ограниченный срок годности, риск бактериального загрязнения, развитие негемолитических посттрансфузионных реакций и снижение агрегационной способности [40; 220].

Дополнительным импульсом к изучению новых методов хранения и обеспечения безопасности КТ стала разработка добавочных или ресуспендирующих растворов – platelet additive solution (PAS), позволяющих значительно уменьшить количество плазменного компонента при сохранении необходимого уровня метаболизма и функциональной полноценности тромбоцитов, и тем самым увеличить длительность хранения до 15-21 дня [13]. При этом доступные в клинической практике добавочные растворы имеют ряд

недостатков, что обуславливает необходимость продолжения исследований их влияния на активацию и апоптоз тромбоцитов в процессе хранения.

Важным аспектом применения КТ в условиях расширения географии медицинских учреждений, является транспортировка КТ, которая предполагает поддержание в термоконтейнере температуры приближенной к рекомендуемой – от $+20^{\circ}\text{C}$ до $+24^{\circ}\text{C}$ с максимально быстрым – в пределах 24 часов, помещением в перемешиватель или непосредственной трансфузией реципиенту [24]. Основные сложности на данном этапе могут возникать при низкой или высокой температуре окружающей среды, особенно при необходимости длительной транспортировки.

Следовательно, актуальность исследования, описанного в данной диссертационной работе, заключается в необходимости улучшения качества концентратов тромбоцитов через усовершенствование их сбора, хранения и доставки. Это достигается за счёт использования дополнительного раствора, содержащего фумарат натрия, в сочетании с контролируемыми условиями хранения при температуре $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ и возможностью комбинированного хранения при транспортировке, что, в свою очередь, приводит к увеличению срока годности тромбоцитов и исключает необходимость в использовании инкубаторов с функцией перемешивания.

Степень разработанности темы

Изучение разделов производственной и клинической трансфузиологии, посвящённых заготовке, хранению, транспортировке и клиническому применению донорских тромбоцитов в последние годы описано в работах, касающихся донорства крови [18], выявления особенностей аппаратного цитафереза тромбоцитов [12], в том числе заготовки и хранения КТ [14], переработки КТ посредством ресуспендирования и патогенинактивации [10],

криоконсервирования тромбоцитов [7], безопасности трансфузионной терапии [4,25], а также клинического применения в онкогематологии при множественных трансфузиях и АВО-несовместимости [22, 28].

В отечественной и иностранной литературе имеются работы по изучению применения добавочных растворов для хранения концентратов тромбоцитов [12, 200]. Несмотря на популярность использования добавочного раствора SSP+ (Франция) некоторыми учеными разрабатывались и оценивались подходы к модификации таких растворов [14, 160, 187] Однако осталось неизученным применение добавочных растворов для пролонгированного холодого хранения концентратов тромбоцитов, а также не оценивались показатели эффективности и безопасности концентратов тромбоцитов при использовании отечественных добавочных растворов.

В то же время регламентированный лабораторный контроль качества концентратов тромбоцитов не дает возможности оценить функциональное состояние тромбоцитов в гемокомпоненте [15], что требует изучения лабораторной оценки дополнительных маркеров функционального изменения клеток за время хранения концентратов тромбоцитов. Роль и изменение концентрации внеклеточных ДНК-содержащих структур для этих целей не изучалось.

Цель исследования

Обосновать и разработать эффективные методы обеспечения качества и безопасности концентрата тромбоцитов на этапе заготовки, хранения и транспортировки.

Задачи исследования

1. Исследовать изменения количественных и качественных показателей концентратов тромбоцитов, сохраненных в плазме и в замещающем растворе SSP+ при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$.

2. Определить различия в морфофункциональных и метаболических свойствах концентратов тромбоцитов при хранении в растворе SSP+ и растворе на основе фумарата натрия на сроках до 15 суток при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$.

3. Проанализировать морфологические изменения тромбоцитов при хранении в плазме, растворе SSP+ и растворе на основе фумарата натрия.

4. Оценить влияние различных температурных режимов хранения ($+4 \pm 2^\circ\text{C}$ и $+20 - 24^\circ\text{C}$) на концентрацию внеклеточных ДНК-содержащих структур.

5. Проверить стабильность показателей концентрата тромбоцитов при комбинированном хранении при транспортировке в термоизоляционном термоконтейнере с дальнейшим хранением в медицинском холодильнике.

Научная новизна исследования

Впервые доказано безопасное и эффективное использование методики холодного хранения КТ с использованием добавочного раствора на основе фумарата натрия при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ с сохранением достаточного уровня метаболизма и гемостатической функции тромбоцитов на всем сроке хранения.

Исследовано воздействие плазмы и заменяющих её растворов, включая SSP+ и фумарат натрия, на морфологические и функциональные характеристики тромбоцитов, а также на уровень свободных ДНК-содержащих структур, при использовании регламентированного температурного режима хранения – при температуре от $+22^\circ\text{C}$ до $+24^\circ\text{C}$, а также при низкой температуре ($+4 \pm 2^\circ\text{C}$).

Впервые метод оценки свободных ДНК-содержащих структур в концентрате тромбоцитов предложен для оценки качества и безопасности гемокомпонента.

Практическая значимость исследования

В эксперименте разработаны и апробированы новые безопасные методы хранения и транспортировки КТ, применимые для внедрения в клиническую практику медицинских организаций для улучшения качества заготавливаемых КТ и рационального их использования.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа выполнена на базе ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России и была одобрена Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 14/20 от 24 сентября 2020 г.). В работе были использованы клинические, лабораторные и статистические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Подход холодового хранения концентратов тромбоцитов обеспечивает лучшие условия для сохранения их метаболической активности и функциональной целостности по сравнению с традиционным хранением при комнатной температуре, что снижает степень деградации клеток и развития инфекционных посттрансфузионных осложнений.

2. Разработанный модифицированный метод хранения с использованием добавочного раствора на основе фумарата натрия при температуре $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ расширяет нормативные условия хранения концентратов тромбоцитов, ранее

ограниченные температурным режимом от +20°C до +24°C при постоянном помешивании.

3. Возможность пролонгированного хранения концентратов тромбоцитов позволяет осуществлять транспортировку совместно с эритроцитсодержащими компонентами, позволяя тем самым упростить логистический процесс.

4. Определение уровня внеклеточной ДНК является дополнительным методом оценки сохранности концентратов тромбоцитов за период их хранения.

Степень достоверности и апробация результатов

Ключевые теоретические и практические положения диссертации представлены в виде устных докладов на российских и международных конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (2022, 2024 г.), XVII Международный симпозиум памяти Р.М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия.» (2023г.).

Внедрение результатов исследования

Научные и практические положения диссертации используются в работе клиник ФГБУ «СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова» ФМБА России, (ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России), в образовательных программах слушателей ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии» ФМБА России.

Личный вклад автора

Автором выполнялся подбор доноров тромбоцитов методом афереза, разработка методики сбора экспериментальных образцов, заготовка гемокомпонентов, отбор и транспортировка проб для исследования. Произведен анализ и статистическая обработка результатов исследования, разработаны выводы и практические рекомендации. Автором лично спроектирован мобильный термоконтэйнер с функцией контроля температуры онлайн, в дальнейшем запатентованный как полезная модель. Результаты работы неоднократно доложены лично автором на научных конференциях.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК, получен 1 патент на полезную модель № 205364 «Мобильный термоконтэйнер для транспортировки биологических материалов», заявка №2021105391, дата государственной регистрации 12.07.2021г.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови. Результаты проведённого исследования соответствуют области исследования специальности 3.1.28. – Гематология и переливание крови, а именно: п. 11 и п. 12.

Структура работы

Диссертация включает введение, обзор литературы, главу, посвящённую методам исследования, четыре главы собственных исследований, обсуждение

полученных результатов, выводы, практические рекомендации, списки сокращений и литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков и 8 таблиц. Библиографический список включает 226 источников литературы из них 46 на русском языке и 180 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1 Клиническое значение и актуальные технологии заготовки концентрата тромбоцитов

Рост числа онкологических заболеваний, увеличение хирургической активности, химиотерапевтического лечения онкологических заболеваний и развитие высокотехнологичной медицинской помощи в Российской Федерации, прежде всего трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) и органной трансплантации, повышает потребность в компонентах донорской крови, в первую очередь эритроцитсодержащих и в КТ [11; 36]. За период с 2009 по 2018 гг. заготовка КТ с последующим клиническим применением увеличилась в 1,9 раза с 467 тыс. до 897 тыс. доз [33].

При этом на первый план выходит проблема бесперебойной доступности КТ и планирование кадрового состава доноров тромбоцитов, учитывая ограниченные сроки хранения КТ в условиях постоянно изменяющейся востребованности в данном компоненте крови.

Совершенствование технологии заготовки КТ обосновано необходимостью с одной стороны повысить уровень инфекционной и иммунологической безопасности, с другой стороны – сохранить функциональную активность тромбоцитов, которые во время процедуры заготовки и последующего хранения подвержены повреждению, т.н. «повреждению тромбоцитов при хранении» и избыточной их активации. Основными патофизиологическими механизмами, ведущими к дисфункции тромбоцитов, являются увеличенная секреция обладающих провоспалительным потенциалом гликопротеинов – трансмембранного CD40 лиганда и P-селектина (CD62P) α -гранул тромбоцитов [104; 107]. Далее окислительный стресс,

который характеризуется развитием ацидоза в результате избыточного потребления активированными тромбоцитами глюкозы, и наличие высокоактивных молекул кислорода, как следствие выработки оксида азота во время хранения – известного регулятора функциональных свойств тромбоцитов, включая ингибирование их агрегации [38; 83; 133].

С целью снижения риска возникновения инфекционных осложнений при использовании стандартного метода хранения тромбоцитов при температуре +22 – 24°C с постоянным перемешиванием, общепринятой мерой профилактики является ограничение срока годности КТ до пяти суток. Несмотря на недостатки такого подхода, хранение тромбоцитов в данных условиях является оптимальным для пациентов с тромбоцитопенией, обусловленной миелодепрессией. В данной ситуации более длительное время циркуляции донорских тромбоцитов *in vivo* позволяет снизить кратность трансфузий КТ и как следствие негативные эффекты такой клинической практики [143; 185].

Актуальность вопроса множественных трансфузий тромбоцитов, например, при программной химиотерапии, ТГСК, связана с дополнительными рисками гемотрансмиссивной передачи патогенов вирусной и бактериальной этиологии в результате контаминации КТ [130; 152].

Также повторные переливания компонентов крови, особенно от разных доноров, могут приводить к выработке у реципиентов антител к человеческим лейкоцитарным антигенам доноров – HLA-аллоиммунизации [20]. В результате иммунный конфликт провоцирует избыточное разрушение донорских тромбоцитов, снижает эффективность трансфузии КТ и требует увеличения кратности трансфузий для профилактики и контроля тромбоцитопении и/или кровотечения [4; 8; 168].

Повторные трансфузии донорских тромбоцитов могут быть связаны с развитием рефрактерности к трансфузиям КТ за счёт иммунных механизмов,

которые могут включать наличие анти-НLA антител и антител к человеческим тромбоцитарным антигенам (НРА) [21; 162]. В таких случаях помимо стандартной переработки тромбоцитов, методикой, направленной на преодоление рефрактерности, может служить подбор КТ с учётом НLA- и НРА-совместимости между реципиентом и донором [23; 26].

Проблема НLA-аллоиммунизации наиболее актуальна при ТГСК от аллогенного донора, которая в данном случае может усугубляться наличием АВО-несовместимости между донором гемопоэтических стволовых клеток и реципиентом, а также предшествующей перегрузкой железом [2; 166; 176; 195]. Однако стоит учитывать тот факт, что, например, при ТГСК в 80% случаев рефрактерность может быть связана с неиммунными причинами – повышенным потреблением и разрушением тромбоцитов [182].

На сегодняшний день главными направлениями работы службы крови становятся развитие донорского потенциала и обеспечение медицинских учреждений компонентами крови, отличающимися высоким качеством и безопасностью. Для решения поставленных задач совершенствуется пропаганда безвозмездного донорства крови с привлечением популярных социальных сетей, внедряется автоматизация лабораторного скрининга для профилактики гемотрансмиссивных инфекций, развивается компонентное донорство, разрабатываются и корректируются клинические рекомендации для рационального применения компонентов крови [30]. Современное программное обеспечение сепараторов клеток крови, используемых при заготовке клеток, позволяет сделать процедуру донации более комфортной для донора, например, за счет автоматического регулирования скорости забора и возврата крови, и эффективной с точки зрения количества заготовленных тромбоцитов и качества в виде снижения доли активированных тромбоцитов [79; 201].

В настоящее время производственная трансфузиология располагает тремя общедоступными способами заготовки КТ: тромбоциты, восстановленные из

лейкотромбоцитарного слоя; тромбоциты, восстановленные из обогащенной тромбоцитами плазмы; тромбоциты, полученные методом афереза (КТa) [73; 103; 161; 197]. Одной из основных количественных характеристик КТa согласно постановлению Правительства РФ от 22.06.2019 №797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и её компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации», которое регламентирует реализацию трансфузионной терапии, является содержание не менее 2×10^{11} тромбоцитов в дозе [24]. К дополнительным требованиям относится содержание остаточных лейкоцитов менее 1×10^6 клеток, pH >6,4 в контейнере к моменту истечения срока годности и не менее 40 мл плазмы на 60×10^9 тромбоцитов.

Обязательными параметрами оценки качества КТ помимо базовых, которые требуют контроля, являются визуальная оценка на предмет наличия феномена «метели» и pH-метрия – индикаторы бактериальной контаминации [31]. При этом технология мониторинга pH совершенствуется, и в настоящее время может быть представлена в виде неинвазивного измерения при использовании контейнеров с оптическим портом совместно с прибором BCSI pH1000 (Blood Cell Storage Inc., США) [72; 124].

Качественные и количественные характеристики каждого конкретного вида КТ, их преимущества и недостатки тщательно изучены как с точки зрения процедуры донации, технологии заготовки, так и в условиях клинического применения у разных категорий больных (Таблица 1) [12; 82; 163].

Таблица 1 – Сравнительная характеристика концентрата тромбоцитов в зависимости от технологии заготовки

Вид КТ	ТЛП	ТОТЛ	КТa
Особенности заготовки	2-х этапное центрифугирование: Жесткое – отдельные доз крови, объединением лейкоцитарных плёнок; Последующее мягкое центрифугирование для удаления лейкоцитов	2-х этапное центрифугирование: Мягкое – консервированной крови; Жесткое – плазмы с последующим объединением 4-6 единиц в 1 дозу тромбоцитов	Тромбоциты, собранные во время однократной кроводачи от одного донора с помощью цитафереза: - Trima Accel - Amicus - MCS+
Преимущества	Технологическая доступность Невысокие финансовые затраты Большой выход тромбоцитов по сравнению с ТОТЛ	Технологическая доступность Невысокие финансовые затраты	Низкий риск гемотрансмиссивных инфекций и аллоиммунизации [210]. Стандартизованные количественные характеристики

Продолжение Таблицы 1

Вид КТ	ТЛП	ТОТЛ	КТa
Недостатки	Риск негемолитических трансфузионных реакций и аллосенсибилизации.	Риск негемолитических трансфузионных реакций, аллосенсибилизации и из-за примеси эритроцитов и лейкоцитов [4; 62]	Высокая стоимость заготовки Риск побочных волевических эффектов и цитратной реакции у доноров [37]

Примечание: ТЛП – тромбоциты, восстановленные из лейкотромбоцитарного слоя; ТОТЛ – тромбоциты, восстановленные из обогащенной тромбоцитами плазмы.

Новым направлением в производственной трансфузиологии является сочетанное или мультикомпонентное донорство с одновременной заготовкой эритроцитов, тромбоцитов и плазмы в различных сочетаниях, имеются детальные данные о достаточном качестве заготовленных компонентов крови, так и о безопасности данной технологии в отношении организма доноров [14; 165]. Большинство авторов отмечают транзиторное снижение уровня гемоглобина, тромбоцитов и лейкоцитов, которое не приводило к серьёзным негативным последствиям и крайне редко требовало отсрочки следующей плановой донации компонентов крови [90; 128]. Некоторые исследователи выявили у доноров значительное снижение уровня сывороточного железа и прокоагулянтной функции тромбоцитов [132]. Также воздействие больших объёмов раствора антикоагулянта, как правило АСД-А, во время процедуры афереза, может приводить к развитию гипокальциемии, т.н. «цитратной

реакции», что требует мониторинга за состоянием донора и своевременной профилактики и/или коррекции состава электролитов [5]. При всех очевидных преимуществах сочетанного донорства, включая экономическую эффективность, одними из основных лимитирующих факторов к повсеместному использованию являются отсутствие регламентирующих документов и необходимость наличия определённых сепараторов клеток крови с соответствующим программным обеспечением и достаточным количеством необходимого расходного материала [139].

Всё вышперечисленное, включая возрастающие потребности в КТ в клинической практике, создает предпосылки и необходимость для дальнейшей разработки и совершенствования технологий заготовки донорских тромбоцитов, которые также включают тромбоциты, лиофилизированные в параформальдегиде с добавлением трегалозы, синтетические, культивированные с помощью биореактора и заготовленные методом акустофореза [52; 81].

1.2 Современные методы переработки концентрата тромбоцитов

Повышение инфекционной и иммунологической безопасности при трансфузии КТ реализуется не только за счёт популяризации регулярного безвозмездного донорства, тщательного отбора доноров, соблюдения правил асептики в момент кроводачи, но и посредством применения методов дополнительной переработки: лейкоредукции, патогенредукции, рентген- или γ -облучения, ресуспендирования и криоконсервирования [30; 75].

Лейкоредукция или фильтрационная элиминация лейкоцитов направлена на удаление бактериальных инфектантов и группы клеточно-ассоциированных вирусов, таких как цитомегаловирус и вирус Эпштейн-Барр, имеющих особо

важное клиническое значение у пациентов с иммунодефицитными состояниями и на достижение остаточного количества лейкоцитов не более 1×10^6 в одной дозе КТ. Данное содержание остаточных лейкоцитов позволяет на порядок снизить риск HLA-аллоиммунизации и посттрансфузионных негемолитических реакций [16; 25; 183]. Внедрение методики лейкоредукции в рутинную клиническую практику значительно снизило частоту фебрильных негемолитических реакций и рефрактерности к трансфузии КТ [85].

Патогенредукция – более совершенный метод профилактики передачи инфекции различной этиологии при трансфузии КТ, основанный на инаktivации Т-лимфоцитов в результате поражающего действия ультрафиолетового света (Theraflex, Macopharma, Франция) и/или фотоактивных веществ, таких как рибофлавин (Mirasol PRT, Caridian, США), амотосален (Intercept blood system, Cerus Corporation, США) и метиленовый синий [10; 34; 177; 181; 205]. Одно из главных преимуществ патогенредукции заключается в отсутствии необходимости дополнительно подвергать КТ рентгеновскому или γ -облучению в процессе переработки, принимая во внимание негативное влияние последнего на сроки хранения компонентов крови [44; 179].

С другой стороны, методы облучения компонентов крови используются для предотвращения возникновения ТА-РТПХ — осложнения, которое отличается чрезвычайно высоким уровнем смертности, в первую очередь из-за возникающей панцитопении и последующих смертельных инфекционных осложнений [9]. Методика облучения компонентов донорской крови с использованием доз от 25 до 50 Гр основана на целенаправленном повреждении ДНК и препятствии размножению Т-лимфоцитов, в то же время, не затрагивая анатомическую целостность клеток, таких как эритроциты, тромбоциты и гранулоциты [135].

1.2.1 Виды добавочных растворов и роль ресуспендирования при хранении тромбоцитов

Относительно новым и перспективным направлением в производственной трансфузиологии является ресуспендирование или заготовка КТ с пониженным содержанием плазмы с компенсаторным замещением PAS [12; 200]. Методика заключается в добавлении в состав КТ компонентов, которые не присутствуют в плазме или антикоагулянтах и имеют воздействие на тромбоциты. Основные требования к замещающему раствору - необходимость содержания субстратов, которые могут служить источником энергии, буферирующим средством, хелатором, солевым компонентом, регулятором метаболизма и стабилизатором мембраны [211].

Замещение добавочными растворами, с одной стороны, позволяет минимизировать риски развития негемолитических трансфузионных реакций, TRALI (transfusion-related acute lung injury, острое трансфузионно-ассоциированное поражение легких) и волемической перегрузки плазмой донора [93; 129; 157]. С другой стороны – воздействовать на метаболизм тромбоцитов за счёт снижения гликолиза, поддержания исходного pH, снижения интенсивности их активации, тем самым удлиняя сроки хранения до семи суток. По данным Международного общества переливания крови (ISBT) PAS условно подразделяются на две группы: для хранения тромбоцитов с содержанием плазмы 30-40%, например, PAS-B (PAS II), PAS-C (PAS III), PAS-D, PAS-E (SSP+), PAS-F и для хранения тромбоцитов с содержанием плазмы не более 20% – M-sol, Setosol и PAS-G, отличающиеся наличием в составе глюкозы, бикарбоната и других консервантов [12]. Степень ресуспендирования регламентирована Европейским директором по качеству медицинских препаратов (EDQM), однако, по мнению отдельных исследователей, возможно

безопасное замещение до 90% плазмы PAS, включающих глюкозу и бикарбонат [47; 118].

В большинстве зарубежных стран и в Российской Федерации для хранения тромбоцитов используется консервирующий раствор SSP+ (Франция), содержащий хлорид, фосфат, цитрат, ацетат натрия, а также ионы калия и магния. Цитрат в растворе выполняет важную функцию, предотвращая запуск процесса свертывания крови. Однако цитрат в сочетании с ионами магния способен влиять на переход ионов калия через мембраны тромбоцитов. Помимо этого, цитрат влияет на объём лактата, который образуется в процессе хранения тромбоцитов [95]. Фосфаты оказывают эффект на тромбоциты двояким образом: во-первых, они функционируют как буфер, предохраняя от снижения уровня pH, и, во-вторых, они воздействуют на гликолитический процесс и образование лактата. Добавление ацетата натрия в раствор обеспечивает стабильность pH, благодаря уменьшению выработки лактата и увеличенному потреблению кислорода тромбоцитами [187]. Тем не менее, повышенные уровни ацетата натрия связаны с более активным процессом включения тромбоцитов в работу, ведущим к их ускоренной деградации и уменьшению жизнеспособности. Присутствие ионов калия и магния в дополнительно вводимом растворе, в значительной степени, подавляет выраженность P-селектинов, ограничивает присоединение фибриногена к тромбоцитам, активированным аденозиндифосфатом (АДФ), и значительно сокращает степень активации тромбоцитов [67; 94; 186].

Некоторые учёные описывают добавление глюкозы в состав последних разработок экспериментальных растворов. Имеются данные, что сохранение тромбоцитов при низкой концентрации плазмы в сочетании с использованием растворов без добавления глюкозы оказывалось неэффективным, ведь к завершению срока хранения уровень глюкозы сильно уменьшался [160]. Так же выявлено, что в средах, содержащих плазмы ниже 15-20%, количество глюкозы

становится критически низким для поддержания адекватного метаболизма тромбоцитов при хранении более пяти дней [187].

Безопасность применения PAS в контексте сохранения функциональной активности тромбоцитов в зависимости от сроков хранения неоднократно и убедительно доказана различными учёными [152; 167; 184; 207]. Тем не менее, несмотря на тенденцию появления всё большего количества данных о снижении риска негемолитических посттрансфузионных реакций и лучшей сохранности КТа при использовании PAS, ряд учёных считает, что нет однозначного ответа относительно очевидных преимуществ ресуспендирования по сравнению с классическим методом заготовки – в 100% плазме [43; 70; 180].

Отечественные исследователи участвуют в актуальных научных разработках в данной области. В частности, Киселёва Е.А. и соавт. разработали метод холодового хранения на основе добавочного раствора SSP+ и детально изучили лабораторные и гемостазиологические эффекты PAS при хранении КТа в течение девяти суток в стандартных температурных условиях [14; 96]. Изменение в растворе заключалось в удалении ацетата натрия и вводе fumarата натрия в качестве питательного элемента, который является одним из компонентов в цикле Кребса. К ключевым выводам можно отнести безопасность предложенного PAS у реципиентов и лучшее поддержание морфофункциональных показателей тромбоцитов по сравнению с SSP+, благодаря более активным процессам аэробного гликолиза, выработке аденозинтрифосфата (АТФ) и более длительной эффективной агрегационной активности.

Тем не менее, учитывая противоречивые данные, возможные различные комбинации видов и концентраций PAS, режимов и сроков хранения, необходимо продолжение исследований, посвящённых переработке и хранению КТ, особенно в контексте сохранения гемостатической функции при

купировании кровотечений, ассоциированных с количественным или качественным дефектом тромбоцитов.

1.3 Влияние добавочных растворов и различных температурных режимов хранения концентрата тромбоцитов на метаболизм, морфологию, гемостатическую функцию и провоспалительный потенциал тромбоцитов

В настоящее время трансфузиологическое сообщество стоит перед дилеммой выбора условий заготовки и хранения тромбоцитов: при стандартном режиме донорские тромбоциты способны дольше выполнять свои функции *in vivo*, но подвержены контаминации во время хранения; при холодовом хранении снижается риск посттрансфузионных реакций, увеличивается срок хранения, но происходит более стремительная элиминация тромбоцитов из кровеносного русла реципиента с необходимостью повторных трансфузий; в тоже время методика криоконсервирования тромбоцитов носит больше экспериментальный характер [88].

1.3.1 Стандартное хранение тромбоцитов при температуре +20 - 24°C

Первоначальная технология поддержания жизнеспособности КТ была обеспечивалась их хранением в холодильной камере при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, аналогично эритроцитсодержащим компонентам крови, до момента получения данных о снижении функциональной активности и изменениях в клеточных структурах тромбоцитов [163].

С течением времени совершенствовались подходы и расходные материалы для хранения тромбоцитов: методика перемешивания видоизменялась от циркулярной к горизонтальной; материал гемоконтейнеров

от поливинилхлорида и 2-этилгексилфталата (ДЕНР), до полиолефина и, безусловно, начало практики использования добавочных растворов [78; 125; 151; 217].

На данный момент общепринятым методом хранения КТ, который позволяет сохранять приемлемо низкий риск негемолитических посттрансфузионных реакций и функциональную активность тромбоцитов, является использование газопроницаемых для кислорода гемоконтейнеров и инкубатора-перемешивателя для поддержания температуры в пределах от +20°C до +24°C. В таком случае достаточная для выполнения функций гемостаза жизнеспособность тромбоцитов гарантированно сохраняется в течение 5-7 суток. Рекомендуемый непродолжительный срок хранения является следствием возможности бактериальной контаминации, накопления продуктов метаболизма тромбоцитов, что подвергает реципиента риску инфекционных осложнений и усложняет планирование заготовки тромбоцитов.

Основным недостатком хранения тромбоцитов при температуре +20 - 24°C является развитие каскада биохимических реакций, приводящих к изменению структуры тромбоцитов и в последующем их функциональных свойств: деформация трехслойной мембраны; либерализация α -гранул и цитозольных белков; повышение экспрессии GРПb/IIIa (мембранный гликопротеин Пb/IIIa) – предиктора активации тромбоцитов [121; 188].

Особенность метаболических сдвигов представлена избыточным гликолизом, негативно отражающимся на функциональной активности митохондрий, в виде истощения депо глюкозы, накопления лактата и снижения рН. На фоне дефицита АТФ снижается активность энергозатратных процессов, в которых участвуют тромбоциты, таких как активация и агрегация. Негативный дополнительный вклад вносит образование активных форм кислорода, снижающих жизнеспособность тромбоцитов во время хранения, а также накопление провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли α ,

интерлейкинов (ИЛ) 1 α , 6, 8 и растворимого CD40 лиганда, который может служить одним из пусковых механизмов развития посттрансфузионных негемолитических реакций и TRALI [58; 155].

1.3.2 Холодовое хранение тромбоцитов

В связи с необходимостью преодоления недостатков хранения тромбоцитов в стандартных условиях, в последние годы возрос научный интерес к изучению альтернативных технологий хранения КТ – холодному хранению при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, которое рутинно применялось до конца 1970-х годов – до момента получения данных о быстрой элиминации тромбоцитов из кровеносного русла, и криоконсервирование [147].

Основная идея использования холодового хранения заключается в сохранении гемостатических свойств тромбоцитов, увеличении сроков их хранения, снижении вероятности передачи бактериальных инфекций, развития ряда посттрансфузионных реакций на фоне сохранения способности выполнять свои функции *in vivo*, не только за счёт ингибирующих эффектов альтернативного температурного режима на интенсивность бактериального роста и метаболизма тромбоцитов, но и протективных свойств добавочных растворов [48; 64; 68].

J. Koessler и соавт. описали, что хранение тромбоцитов в холодových ($+4 \pm 2^\circ\text{C}$) условиях вместо комнатной температуры, их способность к агрегации под воздействием АДФ сохраняется на протяжении более длительного времени – до шести дней, что соотносится с более высоким уровнем маркеров активности, таких как присоединение фибриногена и экспрессия Р-селектина [123].

Согласно данным научных исследований, хранение КТ при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 14 дней, в отличие от стандартного пятидневного хранения

при комнатной температуре, приводит к значительному снижению апоптотической активности тромбоцитов. Этот эффект обусловлен лучшей сохранностью митохондриальных функций, уменьшением продукции активных форм кислорода и снижением секреции провоспалительных медиаторов. В результате такие тромбоциты демонстрируют более выраженную гемостатическую эффективность, что подтверждается работами нескольких независимых исследовательских групп [58, 113, 115, 169, 170, 172, 226].

Тем не менее, одной из негативных особенностей хранения при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, является быстрое выведение тромбоцитов после трансфузии из циркулирующей крови [48]. Структурные и функциональные изменения тромбоцитов, прежде всего, кластеризация гликопротеина $\text{Ib}\alpha$ ($\text{GPIb}\alpha$) на их поверхности, во время холодового хранения получили определение, как «повреждение тромбоцитов при хранении» (platelet storage lesion) [101]. В свою очередь, изменение строения $\text{GPIb}\alpha$ запускает каскад рецепторных взаимодействий, приводящих к усилению апоптоза тромбоцитов и макрофаг-ассоциированному фагоцитозу [214].

Длительная экспозиция тромбоцитов при низкой температуре – в пределах 48 часов – приводит к изменению структуры гликанов клеточной мембраны, в частности значительно увеличивается содержание β -галактозы в единице площади поверхности тромбоцитов в результате избыточной экспрессии лизосомальной нейраминидазы, происходит т.н. процесс десИАлирования как маркера «старения» тромбоцитов [111]. В результате десИАлирования в печени и, в меньшей степени, в селезёнке с помощью гепатоцитарного рецептора Эшвелла–Морелла на поверхности гепатоцитов и макрофагов, происходит распознавание тромбоцитов с избыточной концентрацией β -галактозы с последующей быстрой элиминацией [178].

Холодовое хранение тромбоцитов при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, несмотря на сокращение времени их циркуляции по сравнению с комнатными условиями,

сопровождается рядом структурно-функциональных изменений. К ним относятся необратимая трансформация дискоидной формы в сферическую, повышенная продукция тромбоксана A₂, а также усиленная экспрессия поверхностных маркеров активации (P-селектин и GPIIb/IIIa). Однако важные метаболические показатели, включая активность интегринов и сохранность митохондриальных мембран, демонстрировали лучшую стабильность после 20 дней холодового хранения по сравнению с 5-дневным содержанием при комнатной температуре [198].

Холодовое хранение, с одной стороны, обладает рядом преимуществ по сравнению с классическими условиями хранения – снижение уровня метаболической активности, замедление бактериального роста, сниженная продукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-8), повышенная гемостатическая активность и время формирования сгустка [59; 80; 120; 164; 169]. С другой стороны – оказывает негативное влияние на анатомическую структуру тромбоцитов и увеличивает скорость образования микроагрегатов (Таблица 2) [101; 145; 223].

Таблица 2 – Морфофункциональные характеристики тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме в зависимости от технологии хранения

Параметр/ Условия хранения	Комнатная температура 5-7 суток	Холодное хранение 5-7 суток	Криоконсервация ДМСО (месяцы-годы)
Средний объём тромбоцита	Норма	Норма или незначительно снижен	Снижен

Продолжение таблицы 2

Параметр/ Условия хранения	Комнатная температура 5-7 суток	Холодное хранение 5-7 суток	Криоконсервация ДМСО (месяцы-годы)
рН	Сильно снижен	Несколько снижен	Несколько снижен
Содержание микрочастиц	Низкое	Повышено	Сильно повышено
Время формирования сгустка	Увеличено	Без изменений или снижено	Сильно снижено
Связывание vWF-GPIIb/IIIa	Норма	Повышено	Повышено
Кластеризация GPIIb/IIIa	Несколько увеличена	Сильно увеличена	Нет данных

Примечание: ДМСО – диметилсульфоксид (Me_2SO); vWF – фактор фон Виллебранда; GPIIb/IIIa – гликопротеин IIb/IIIa

Изучение новых параметров хранения, включая необходимость подробного анализа воздействия температуры $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ и отказ от технологии перемешивания, обуславливает необходимость детального исследования их влияния на способность тромбоцитов осуществлять гемостатическую роль в контексте сосудисто-тромбоцитарного гемостаза.

Согласно работе Reddoch К.М. и соавт. при сравнительном анализе трёх режимов хранения КТa в течение пяти суток: при комнатной температуре с перемешиванием, при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ с и без перемешивания; наилучшие

показатели прокоагулянтной активности были в группе холодового хранения без влияния эффекта перемешивания [169]. Marini I. с соавт. при анализе влияния различных составов КТа – в 100% плазме, SSP+ 35% и SSP+ 20% при холодовом хранении, доказали лучшие протективные эффекты добавочных растворов по сравнению с плазмой [134].

В ходе дальнейших исследований группа Reddoch-Cardenas К.М. установила, что тромбоциты, хранившиеся при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, обладают ограниченным сроком циркуляции в кровотоке (не более 24 часов), что снижает их эффективность для коррекции тромбоцитопении, но сохраняет способность останавливать кровотечения [172]. Более детальный анализ показал, что даже после 15 суток хранения в PAS при указанной температуре клетки сохраняют структурную целостность и митохондриальную функцию на уровне, близком к исходному, что подтвердило первоначальные выводы об их гемостатической эффективности [171].

Исходно потенцирующее действие низкой температуры на увеличение плотности фибринового сгустка оставалось необъясненным, а ускоренную элиминацию тромбоцитов некоторые ученые рассматривали как механизм защиты организма от избыточного тромбообразования, который сформировался в процессе эволюции [105].

В процессе изучения были установлены механизмы относительно формирования более механически прочных и в тоже время эластичных сгустков при хранении тромбоцитов при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, прежде всего за счёт усиления взаимодействия между XIII фактором свёртывания, также известного как фибриназа или фибринстабилизирующий фактор, и поверхностью тромбоцитов [153]. Фибриназа участвует в уплотнении сгустка путём формирования ковалентных связей между молекулами фибрина. Второй механизм осуществляется с помощью связывания с α_2 -антиплазмином и, таким образом повышается невосприимчивость тромба к компонентам

фибринолитической системы [102]. В отличие от фибриназы, криопротектор ДМСО, который в данном исследовании применялся для оценки степени и скорости помутнения, как индикатора полимеризации фибрина, ускорял растворение низкомолекулярных соединений, что может иметь практическое значение в технологии криоконсервации тромбоцитов.

Montgomery R.K. и соавт. предлагают более детальное объяснение усиленной агрегационной способности тромбоцитов при низких температурах хранения: по их представлениям, в основе лежит механизм усиленной гликопротеин Iba-ассоциированной активации тромбоцитов и более активного связывания с vWF [145]. В эксперименте Chen W. с соавт. была подтверждена гипотеза о том, что связывание охлаждённых тромбоцитов с vWF, приводит к быстрой элиминации последних из кровеносного русла, а также определена регулирующая ингибиторная роль GPIba при взаимодействии с vWF, что в будущем позволит увеличить период циркуляции тромбоцитов после трансфузии [61].

M. Stolla и соавт. сравнили функциональные свойства компонентов крови, хранившихся при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ на протяжении 10–15 суток в плазме и добавочных растворах (Intersol/Isoplate), с образцами, хранившимися в течение трёх дней. Результаты показали сопоставимую функциональную активность тромбоцитов *in vitro* независимо от среды хранения, однако *in vivo* восстановительная способность клеток была выше после хранения в плазме. Авторы подчеркивают необходимость дальнейших исследований для установления клинической значимости выявленных различий в плане гемостатической эффективности [198].

Также требуется изучение влияния комбинации новых методов заготовки тромбоцитов и пролонгированного холодового хранения на эффективность их гемостатической функции. В частности, Agey A. с соавт. выявили значительное снижение плотности и ретракции сгустка у патогенинактивированных

тромбоцитов, заготовленных в плазме и PAS (Intersol) в соотношении 35% - 65%, уже к 14 суткам холодого хранения по сравнению с тромбоцитами в 100% плазме [42].

Учитывая вышесказанное, с целью возможности эффективного и безопасного применения КТ в условиях хранения при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ в клинической практике, требуется совершенствование и разработка новых технологий для нивелирования или преодоления негативных последствий низкой температуры.

Современные исследования сосредоточены на поиске инновационных компонентов для буферных растворов, способных оптимизировать условия холодого хранения тромбоцитов. Клинически значимые результаты получены при использовании антиоксидантных комплексов, в частности комбинации ресвератрола с цитохромом С. Данный подход, как показали исследования, обеспечивает надежную защиту митохондриального аппарата, существенно снижает окислительный стресс и позволяет сохранять функциональную активность тромбоцитов на исходном уровне в течение десяти суток хранения [76].

Работа Lannan K.L. с соавторами внесла важный вклад в понимание механизмов действия ресвератрола, выявив его селективную способность подавлять нежелательную активацию тромбоцитов без ущерба для их гемостатической функции [127]. Эти данные имеют принципиальное значение для разработки новых поколений консервирующих растворов.

Также исследуется влияние таких добавок, как натрия октаноат на снижение апоптоза и скорости клиренса тромбоцитов при холодогом хранении [45].

Например, Handigund M. и соавт. провели исследование, дизайн которого заключался в добавлении антиоксиданта N-ацетилцистеина в КТ, что позволило улучшить восстановление тромбоцитов после холодогом хранения в течение

десяти суток за счёт снижения активации, связывания с аннексином-V, уровня сиаловой кислоты и замедления образования свободных радикалов ионов кислорода [99]. В ходе исследования специалисты из США проанализировали PAS Intersol (Fenwal, США) - один из двух одобренных FDA добавочных растворов. Результаты показали, что при температурном режиме $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ тромбоциты сохраняют свои характеристики как по количественным, так и по качественным параметрам даже после 15 дней хранения [89]. В исследовании Braathen H. и соавт. одним из главных выводов в контексте применения концепции холодового хранения тромбоцитов на основе PAS-ИМ без перемешивания, являлось то, что КТ соответствовал требованиям EDQM на протяжении всего периода эксперимента, который составил рекордный 21 день [55]. Хранение тромбоцитов при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ в добавочном растворе T-PAS+, аналогичным по составу с SSP+, также позволяло обеспечить функциональную и метаболическую активность тромбоцитов в течение 18 дней и соответствовало стандартам FDA [170].

Более того, доступны данные об успешном клиническом применении КТ после хранения при низких температурах. В условиях дефицита доноров крови в эпоху пандемии COVID-19, при достижении предела хранения КТ, заготовленных на основе плазмы, к пяти суткам, тромбоциты не утилизировали, а продолжали хранить в температурном диапазоне $+1^\circ\text{C}$ - $+6^\circ\text{C}$ без перемешивания до момента необходимости трансфузии реципиенту. Использование 61 трансфузии КТ взрослым пациентам с острыми кровотечениями (n=40) преимущественно после кардиохирургических операций, показало клиническую эффективность и безопасность, при этом медиана холодового хранения была шесть суток, а максимальный период составил девять суток [218].

Несмотря на потенциал использования температуры $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ с точки зрения сохранения функциональной активности тромбоцитов, удобства

применения в рутинной клинической практике и отсутствия необходимости дополнительного оснащения медицинских организаций дорогостоящим и сложным в эксплуатации оборудованием, данная технология в любом случае ограничена сроками хранения [89].

1.3.3 Методика криоконсервирования тромбоцитов

Параллельно изучается и совершенствуется другой перспективный метод хранения КТ, который представлен технологией криоконсервирования, и включает следующие последовательные этапы: цитаферез тромбоцитов, замораживание с применением криопротектора в течение 24 часов после заготовки; хранение при низких (-80°C) или ультранизких температурах (-150°C) в электрическом морозильнике или в жидком азоте; последующее размораживание и удаление криопротектора [28; 119; 199]. Выбор соответствующих температурных режимов обусловлен тем, что в таких условиях в клетках практически полностью прекращаются биохимические процессы.

Основные преимущества криоконсервации заключаются в возможности карантинизации компонентов крови для исключения риска гемотрансмиссивных инфекций, создания стратегического запаса необходимого количества и видов КТ и долгосрочном планировании производственной работы отделения или станции переливания крови. При этом не представлено рекомендаций относительно допустимой длительности хранения [29].

В отличие от криоконсервирования эритроцитов, замораживание КТ в целом является экспериментальной технологией, несмотря на то, что разработка методов криоконсервации проводится с 1960-х годов, и данный подход успешно применяется для хранения клеток и тканей человека, включая

гемопоэтические стволовые клетки [3; 209]. В настоящее время в качестве основного криопротектора рассматривается 5-6% ДМСО и 2% ДМСО в сочетании с добавочным раствором ThromboSol® [53].

Нерешёнными проблемами остаются последствия деструктивного воздействия низких температур на мембраны и органеллы клеток, что приводит к снижению функции тромбоцитов за счёт изменения агрегационной активности при взаимодействии с веществами-индукторами первичного звена гемостаза, такими как адреналин, коллаген и АДФ [63; 154; 206].

Негативный эффект криоконсервирования проявляется снижением функциональной активности тромбоцитов на 63-70% от исходного уровня при температуре +22 – 24°C, что ожидаемо приводит к неэффективным трансфузиям [87; 193]. Это может объясняться быстрой элиминацией размороженных тромбоцитов из кровеносного русла реципиента из-за их разделения во время хранения на две субпопуляции в зависимости от степени экспрессии GPIIb/IIIa [191].

В связи с этим анализируются новые подходы для повышения качества замороженных КТ – применение различных концентраций, существующих и новых криопротекторов, добавление PAS, ингибиторов рекристаллизации льда [190; 219]. Таким образом, помимо ДМСО разрабатываются альтернативные криопротекторы, обладающие различной степенью цитотоксичности: диметилацетамид (ДМАЦ) в комбинации с глицерином, 1,2-пропандиолом, оксиэтилированным глицерином; тромбокриодмац (5% ДМАЦ + 5% глюкозы в воде для инъекций); трегалоза с добавлением фосфата [17; 39; 156]. Ветошкин К.А. с соавт. предложили использование криопротектора на основе гексаметиленбистетраоксиэтилмочевины и ДМАЦ при температуре -80°C и -196°C, соответственно, и не выявили различий в структуре тромбоцитов и их функциональности в зависимости от условий хранения [6]. Представлены данные об успешном опыте применения замороженных тромбоцитов при

использовании в качестве криопротектора 5% ДМСО в комбинации с декстраном 40 и хранении в жидком азоте при температуре -196°C с доказанной клинической эффективностью и отсутствием побочных реакций у реципиентов [7].

Комбинация 6% ДМСО и добавочного раствора SSP+ при температуре -80°C с последующим быстрым оттаиванием при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, возмещением плазмой и SSP+ показала достаточный цитопротективный результат хранения [117]. Meinke S. с соавт. представили данные об успешном криоконсервировании КТ после предварительной патогенинактивации амотосаленом и ультрафиолетовым светом, что открывает перспективы повышения качества тромбоцитов при использовании ультранизких температур для долгосрочного хранения [141].

Таким образом, альтернативные технологии хранения тромбоцитов в современных условиях имеют большой научный и клинический потенциал [112].

1.4 Методы определения и маркеры оценки метаболизма и функциональной активности тромбоцитов в процессе хранения

Тромбоциты участвуют не только в процессах коагуляции, но и как активное звено трофических и иммунных реакций за счет способности секретировать в кровоток цитокины, хемокины и факторы роста [98]. При этом сложно определить грань между физиологическим и патофизиологическим воздействием тромбоцитов, что сопровождается риском передачи избыточного количества активированных тромбоцитов и их микровезикул при трансфузии КТ реципиенту [84]. С одной стороны – это требует очистки КТ от активных форм тромбоцитов, с другой стороны – создает предпосылки к разработке

«иммунонаправленных» тромбоцитов в зависимости от клинической ситуации, например, тромбоцитарный лизат как компонент регенеративной медицины [140].

Многофункциональность тромбоцитов обуславливает необходимость комплексного подхода к их исследованию в процессе хранения. Основное внимание при оценке уделяется количественным параметрам (концентрации тромбоцитов, тромбокриту, среднему объему клеток и показателю гетерогенности популяции - ширине распределения по объему), а также морфологическим характеристикам. Последние включают цитологический анализ с применением различных методов окрашивания, в частности азур-эозином по Романовскому, и обязательный контроль стерильности, проводимый путем инкубации в тиогликолевой среде с последующим культивированием на кровяном агаре.

Известно, что в процессе хранения происходит снижение количества тромбоцитов. Согласно данным сравнительного исследования Johnson L. и соавт., при хранении концентратов тромбоцитов, приготовленных в соотношении 30% плазмы и 70% раствора SSP+, наблюдалось постепенное снижение количества тромбоцитов. К 14-м суткам хранения при комнатной температуре и $+4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ количество клеток уменьшилось на 15 - 18% от исходного уровня, а к 21-м суткам - на 30 - 35%. При этом статистически значимых различий между двумя температурными режимами хранения выявлено не было [115].

Данные литературы указывают на то, что с увеличением периода, в течение которого концентрат тромбоцитов хранится в PAS, происходит увеличение их объема. Исследователи расценивают это как индикатор старения тромбоцитов [129; 225]. Уже в течение первых 24 часов холодого хранения наблюдается трансформация дисковидной формы тромбоцита в сферическую [106; 192].

При хранении также происходит изменение метаболической активности в тромбоцитах, которая может быть изучена с помощью анализаторов кислотно-щелочного и газового состава крови, и включает исследование содержания бикарбоната, глюкозы, лактата, АТФ, парциального давления кислорода, двуокиси углерода и кислотно-основного состояния [47].

В физиологических условиях потребности тромбоцитов в энергии поддерживаются двумя метаболическими путями-анаэробным гликолизом и более эффективным методом синтеза АТФ – кислородзависимым окислительным фосфорилированием [71]. При хранении тромбоцитов *ex vivo* активируется механизм гликолиза, сопровождающийся потреблением глюкозы и образованием молочной кислоты, что при недостаточной буферной емкости среды приводит к заметному снижению рН. Однако, присутствующие в плазме бикарбонаты эффективно нейтрализуют кислые метаболиты, обеспечивая поддержание физиологического уровня рН в течение стандартного периода хранения тромбоцитных концентратов [93]. Важную роль в этом процессе играет ацетат, входящий в состав питательной среды SSP+: он метаболизируется путем окислительного фосфорилирования, что не только обеспечивает клетки энергией, но и способствует стабилизации рН за счет связывания ионов водорода [49, 97, 149].

Несмотря на то, что при пролонгированном холодовом хранении отмечается снижение метаболизма тромбоцитов и значительные морфологические изменения, отмечено сохранение их функциональной активности на достаточно высоком уровне на всем сроке хранения, прежде всего за счет сниженной интенсивности гликолиза, и тем самым сохранения достаточного уровня глюкозы [13].

1.4.1 Лабораторная оценка степени активации и агрегационной способности тромбоцитов

Процесс коагуляции крови — это последовательность химических реакций, в результате которых образуется сетка из фибриновых волокон, превращающая кровь из жидкой формы в гелеобразную массу [202].

Основные процессы коагуляции крови зависят от мембран и значительно усиливаются при взаимодействии с отрицательно заряженными фосфолипидными оболочками тромбоцитов, к которым присоединяются факторы свертывания из плазмы [22].

Качество КТ определяется способностью выполнять гемостатическую функцию за счёт увеличения количества, циркулирующих в периферической крови тромбоцитов непосредственно после трансфузии и сохранения их прокоагулянтной активности. Для комплексной оценки эффективности гемостаза, наряду с клиническими проявлениями (прекращением острого кровотечения и геморрагического синдрома), используются объективные лабораторные методы диагностики. Важными инструментами являются тест генерации тромбина и тромбоэластография, позволяющие анализировать физико-химические свойства формирующегося сгустка [100]. Не менее значимы различные виды агрегационных тестов: коллаген-индуцированная агрегация отражает функциональную активность специфических рецепторов GPIa/IIa и GPV; АДФ-зависимая агрегация свидетельствует о сохранности внутриклеточных сигнальных путей; а ристоцетин-индуцированная агрегация позволяет оценить структурную целостность внешней мембраны тромбоцитов [41].

Критериями оценки качества КТ, которые не входят в рутинную практику и определяются с помощью проточной цитофлуорометрии, могут быть маркеры активации и апоптоза тромбоцитов – процессы, которые неизбежно протекают

при заготовке и в процессе хранения. Особым маркером активации тромбоцитов служит процесс экзоцитоза внутриклеточных гранул, сопровождающийся транслокацией их компонентов (в частности, Р-селектина) на клеточную мембрану [167].

Так же, когда тромбоциты активируются, они освобождают фрагменты фосфатидилсерина, которые обычно находятся на внутренней стороне клеточной мембраны. Такие участки мембраны становятся целями для аннексина V – индикатора для апоптоза, этот процесс ведет к созданию тромбоцитов с усиленной способностью к свертыванию крови [142].

Перспективными дополнительными методиками оценки старения тромбоцитов могут стать определение экспрессии с последующей интерпретацией результатов следующих молекул: GPIIb/IIIa (интегрин α IIb β 3); CD63 (лизосомальный мембранный гликопротеин); CD42b (мембранный тромбоцитарный гликопротеин Ib); JC-1 связывание, как мера митохондриального мембранного потенциала; CD61⁺ в качестве оценки количества микроагрегатов; а также уровень лактатдегидрогеназы, повышающейся при повреждении мембраны тромбоцитов [47; 100].

1.4.2 Современные представления о функциональном потенциале, активации и апоптозе тромбоцитов

В процессе активации и апоптоза клеток, циркулирующих в кровотоке, а также эндотелиоцитов, происходит выброс на поверхность микрочастиц представляющих собой группу гетерогенных микровезикул, способных оказывать влияние на интенсивность процессов воспаления, иммунного ответа и тромбообразования за счет регуляции синтеза провоспалительных ферментов и водорастворимых медиаторов в не- и иммунных клетках [57; 92; 126; 159]. Большая часть микровезикул приходится на тромбоциты, которые впервые

были обнаружены в 1967 г. Wolf P. и трактовались как «тромбоцитарный мусор», а в настоящее время доступны изучению с помощью модифицированной методики проточной цитофлуориметрии и анализа траекторий наночастиц [86; 158; 222]. Микровезикулы тромбоцитов вовлечены в стимулирование воспаления за счет гиперэкспрессии мембранных гликопротеинов, таких как GPIIb/IIIa (CD41), комплекса Ib/IX и маркеров активации тромбоцитов – P-селектина и фосфолипида [69; 109; 221].

Актуальным для клинической трансфузиологии является то, что в процессе заготовки и хранения тромбоцитов, происходит увеличение количества микрочастиц, способных оказывать негативное влияние на конкретного реципиента, особенно с измененным воспалительным статусом [50; 51]. С другой стороны, избыточное количество микровезикул, обладающих намного более выраженной прокоагулянтной способностью по сравнению с тромбоцитами, объясняет отсутствие тенденции к увеличению кровотечений на фоне длительной и выраженной тромбоцитопении у больных с онкогематологическими заболеваниями [138; 189].

Появляются новые данные о расширенных способностях тромбоцитов, которые не ограничиваются только классическим участием в сосудисто-тромбоцитарном звене гемостаза, транспорте биологически активных веществ и ряде других известных функций. В частности, тромбоциты могут быть ответственны за ускорение процесса метастазирования при злокачественных заболеваниях [175]. В таких случаях тромбоциты при сохранении своего гемостатического потенциала, имеют специфические изменения РНК и профиля белков, что может иметь клиническое значение в ранней диагностике и прогнозе течения онкологического заболевания.

1.4.2.1 Роль ДНК-внеклеточных ловушек в иммунном ответе

В контексте участия тромбоцитов в физиологическом иммунном ответе человека важно понимать наличие механизма защиты от патогенных микроорганизмов, прежде всего грибковой и бактериальной этиологии, известного как нетоз и впервые описанного для нейтрофилов. Прижизненный вариант нетоза характеризуется формированием т.н. нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps – NETs) в результате секреции из нейтрофилов на поверхность клетки сетей ДНК, гистонов, белков-протеаз и антимикробных пептидов, опутывающих, а затем элиминирующих патоген [56]. В последующем механизм формирования внеклеточных ловушек ДНК был описан и у других клеток – эозинофилов, моноцитов, макрофагов и тромбоцитов [91]. У последних этот процесс реализуется посредством регуляции экспрессии рецепторов распознавания образов (Toll-подобные рецепторы) – белков, кодируемых клетками врожденной иммунной системы, таких как эндотелиоциты, нейтрофилы, дендритные клетки [65]. В свою очередь Toll-подобные рецепторы идентифицируют молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном, и запускают каскад иммунных реакций [174].

Такая реакция всегда сопровождается воспалением, осаждением нитей фибрина на поверхности микроорганизмов, что является триггером для привлечения в зону поражения тромбоцитов, которые дополнительно адгезируют между собой бактерии или гифы грибов и, тем самым повышают эффективность нетоза [196].

Опасность нетоза для человека возникает в случае его избыточности в виде наличия большого количества токсичных для окружающих тканей гистонов. Они усиливают и поддерживают системный воспалительный ответ организма, а в случае бактериального менингита, ассоциированного с *Streptococcus pneumoniae*, даже ухудшающего прогноз из-за снижения

очищающей способности спинномозговой жидкости [144]. Более того описана возможность толерантности опухолевых клеток к нетозу, а также их способность использовать механизмы нетоза для снижения противоопухолевого надзора со стороны Т-киллеров, что может приводить к ускорению роста опухолевых клеток и метастазированию. Например, при раке молочной железы за счет экспрессии рецептора CCDC25 и при раке легкого за счет разрыва соединения с онкопротектором тромбоспондином-1 [77; 136].

1.4.2.2 Новые потенциальные маркеры оценки старения тромбоцитов

Одним из механизмов стимулирования иммунного ответа за счет активации нейтрофилов является воздействие на их клеточную поверхность молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением (DAMPS – damage-associated molecular patterns), включающих белки, пептиды (N-формил, TFAM) и другие метаболиты, источником которых в свою очередь является митохондриальная ДНК представленная в большом количестве в тромбоцитах [173; 204]. Увеличение количества продуктов митохондриальной ДНК в системном кровотоке, также может являться одним из признаков нарушенных процессов внутриклеточного метаболизма тромбоцитов. Повышенные значения митохондриальной ДНК в компонентах донорской крови, включая тромбоциты, могут приводить к посттрансфузионным осложнениям, в частности TRALI [54]. Chegini A. и соавторы выявили прогрессивное увеличение продуктов DAMPS митохондриальной ДНК в КТa в условиях хранения при температуре +20 - 24⁰ С в течение пяти суток, в то время как в КТ, заготовленном из плазмы богатой тромбоцитами, отмечалось их снижение [60]. В представленном исследовании, однако, количество DAMPS митохондриальной ДНК не коррелировало с

частотой посттрансфузионных реакций, что возможно связано с малой выборкой клинических случаев.

Одной из причин развития повреждения тромбоцитов во время хранения может являться нарушенная регуляция микро-РНК тромбоцитов, характеризующаяся продолжением синтеза белков *ex vivo* [224]. Соответственно определение количества микро-РНК может стать потенциальным маркером жизнеспособности тромбоцитов во время хранения.

Таким образом, достижения экспериментальной трансфузиологии и появления новых и более детальных данных о метаболизме тромбоцитов во время хранения и участии в иммунных реакциях, создают предпосылки к необходимости продолжения лабораторных и клинических исследований в данном направлении.

1.5 Методы транспортировки концентрата тромбоцитов в медицинские организации

К текущему моменту единственным и общепринятым методом перемещения компонентов крови является использование термоконтейнеров и холодильного оборудования, при этом тромбоциты, как и другие клетки организма человека, чувствительны к изменяющимся условиям окружающей среды, которые могут изменяться при транспортировке. Транспортировка тромбоцитов, этап заготовки и особенности хранения неразрывно связаны между собой, так как состав КТ и условия хранения могут влиять на негативное воздействие транспортировки на качество компонента крови.

Ключевыми условиями при транспортировке КТ являются предшествующая ей длительность хранения, наличие добавочного раствора,

температура внутри транспортного контейнера и длительность периода без перемешивания.

В настоящее время гемоконтейнеры, в которых хранятся тромбоциты, изготовлены из газопроницаемого пластика, чтобы обеспечить достаточное количество кислорода для поддержания процессов аэробного метаболизма. Считается, что тромбоциты необходимо хранить при температуре +20 - 24°C, основываясь на доказательствах того, что холодное хранение приводит к необратимым изменениям мембраны тромбоцитов, приводящим к их фагоцитозу после трансфузии реципиенту, в то время как хранение при более высоких температурах увеличивает риск бактериальной транслокации [203]. Соответствующие правила и риски распространяются и на период транспортировки тромбоцитов.

Основная задача перемешивания – это обеспечение равномерного обмена тромбоцитов в пакете, взвешенных в плазме и/или в PAS, с окружающей средой. Доказано, что жизнеспособность тромбоцитов без перемешивания снижается из-за достижения критически важного рН <6,2 в результате гипоксии и на фоне избыточной продукции молочной кислоты [148; 213]. При транспортировке, несмотря на наличие колебаний, связанных с движением термоконтнера, не происходит достаточной оксигенации особенно, если одновременно транспортируется несколько КТ сложенных друг на друга [217].

Изначально изучение влияния условий и длительности транспортировки тромбоцитов в течение десяти часов при температуре +4°C и +22°C не выявило существенных негативных воздействий на примере процессов агрегации и способности тромбоцитов поглощать серотонин, за исключением сниженного ответа на гипотонический шок [122]. Однако с течением времени и появлением технической возможности изучать метаболизм тромбоцитов на более детальном уровне, роль условий хранения на этапе хранения и транспортировки стала более значимой.

Сейчас представлено достаточное количество исследований, оценивающих влияние методов заготовки, вида сепаратора для цитафереза, наличия добавочного раствора в КТ и длительности периода без перемешивания, согласно которым максимальный безопасный период транспортировки для тромбоцитов, заготовленных в плазме не должен превышать 8 часов и 24 часа для КТ с PAS, а температура внутри термоконтейнера не должна быть ниже +20°C [146; 216]. В то же время Dumont L.J. и соавт. не выявили более выраженного снижения pH у различных видов КТ к семи суткам хранения при температуре +20 – 24°C после транспортировки в течение 24 часов по сравнению с тромбоцитами, у которых было постоянное перемешивание [74]. Интересные данные получены в ходе исследования влияния троекратно повторяющихся прерываний в перемешивании КТ в течение 24 часа каждое, по сравнению с однократной остановкой – к семи суткам хранения pH был выше в первой группе сравнения [215].

Тем временем Ассоциация американских банков крови (AABB) в своем 30-м издании Стандартов допускает транспортировку тромбоцитов без перемешивания в течение 24 часов, что находит подтверждение и в действующих регламентирующих документах Российской Федерации [24; 194]. В вышеупомянутом документе AABB также рекомендует обеспечить постоянный контроль температуры при транспортировке замороженных компонентов крови.

В целом изучение влияния транспортировки на качественные характеристики тромбоцитов и инфекционную безопасность, представляется сложной задачей, учитывая большое количество динамических факторов, которые могут оказывать влияние на результаты исследований.

Перспективные направления на этапе логистики тромбоцитов в условиях увеличения длительности транспортировки, в частности в области медицины катастроф, связаны с разработкой новых пластиковых пакетов с улучшенной

функцией газообмена, замещающих растворов с большей буферной емкостью с целью лучшего протективного действия на метаболизм митохондрий тромбоцитов, а также с применением беспилотных летательных аппаратов (дронов). Первые данные убедительно показывают эффективность дронов сокращать время транспортировки компонентов крови, включая тромбоциты, при сохранении необходимого температурного режима [108; 131].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Технология холодового хранения тромбоцитов в плазме и добавочном растворе SSP+

Для проведения исследования были отобраны 20 доз концентратов тромбоцитов, заготовленных с использованием аферезной системы Trima Accel (Terumo BCT, Inc.) на базе ФГБУ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России от доноров мужского пола, давших добровольное информированное согласие. Каждую дозу разделяли на две идентичные по объему части (100-110 мл): одну сохраняли в 100% аутоплазме, другую - в растворе SSP+ (MascoPharma, Франция) в пропорции 30% плазмы и 70% консервирующего раствора.

Условия хранения предусматривали поддержание температуры $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ в сертифицированных медицинских холодильниках в течение 15-дневного периода. Лабораторные исследования проводились в день заготовки образцов с последующим контролем на 5, 10 и 15 сутки с применением оборудования, имеющего соответствующую сертификацию в РФ. Количественную оценку тромбоцитов выполняли на гематологических анализаторах Medonic M10/M20 (Boule Medical AB, Швеция) и методом фазово-контрастной микроскопии. Биохимические параметры (рН, глюкоза, лактат, бикарбонаты, газовый состав) анализировали на аппарате ABL 800 FLEX (Radiometer, Дания).

Морфологические исследования включали микроскопию с использованием микроскопа Nikon Eclipse E200 ($\cdot 1000$). Исследовались цитологические препараты (мазки, окрашенные азур-эозином по Романовскому). На каждый образец изготавливалось по 4 микропрепарата. Морфологическая оценка и морфометрия проводилась в 10 полях зрения на

каждом препарате. В поле зрения подсчитывалось общее количество тромбоцитов и количество тромбоцитов каждого из морфологических подтипов, далее был произведен пересчет в проценты, где общее количество тромбоцитов в поле зрения принималось за 100%.

Контроль стерильности производился путем посева в стерильном боксе с соблюдением асептических условий на 15 день хранения. Образец КТ в количестве по 1 мл заседали в 2 пробирки с тиогликолевой средой (10–15 мл). Инкубация проводилась при комнатной температуре и при +37°C в течение 72 часов с последующим высевом на кровяной агар. В результате исследований рост микроорганизмов не обнаружен ни в одной пробе.

2.2 Технология холодового хранения тромбоцитов в экспериментальном добавочном растворе, содержащем фумарат натрия, и растворе SSP+

Для проведения исследования были использованы 15 образцов концентратов тромбоцитов, заготовленных методом афереза на системе Trima Accel (Terumo BCT, Inc., Бельгия) на базе ФГБУ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России. Все доноры, участвовавшие в исследовании, предоставили письменное информированное согласие на обработку персональных данных и использование своих биологических материалов. Отбор доноров и проведение медицинского обследования осуществлялись в полном соответствии с действующими нормативными требованиями Российской Федерации, регламентирующими деятельность Службы крови.

После сбора тромбоцитов выполнялось стерильное соединение трубок контейнера (Terumo TSCD-II, Terumo BCT Inc, Бельгия) и системы для транспортировки (ВК 10-01 «ЛЛ», Россия), чтобы разделить дозу КТ на две

аликвоты объемом каждая 100–110 мл для дальнейшего исследования. К каждой аликвоте концентрата тромбоцитов добавляли специальный раствор для удлинения срока хранения (ДРЭ или SSP+) в соотношении 30% объема плазмы и 70% объема добавочного раствора.

В данном исследовании выполнен анализ пятнадцати образцов концентратов тромбоцитов в условиях холодного хранения. Научная работа включала оценку качественных характеристик, изучение метаболических процессов и показателей гемостатической функции, а также исследование экспрессии маркеров клеточной активации и апоптоза в сочетании с анализом морфологических преобразований тромбоцитов. Все образцы сохранялись при постоянно поддерживаемой температуре ($+4 \pm 2^\circ\text{C}$) в медицинском холодильнике, специально разработанном для хранения компонентов крови. Контрольные измерения выполнялись сразу после забора материала, а затем на пятый, десятый и пятнадцатый день периода хранения.

Лабораторные исследования выполнялись с использованием зарегистрированных в установленном порядке медицинских изделий, включающих специализированное оборудование, химические реактивы и расходные материалы однократного применения. Подсчёт числа тромбоцитов происходил на гематологическом приборе Medonic M20 M-Series фирмы Boule Medical AB (Швеция). Для биохимических анализов, измерения уровня pH и газов крови использовали анализатор ABL 800 FLEX компании Radiometer Medical ApS из Дании. Заключение о характеристиках свёртываемости крови выносилось после анализа на тромбоэластографе TEG® 5000 от Haemoscope Corporation из США, который определяет физические свойства сгустка (скорость образования, время начала, размер и устойчивость). Определение экспрессии P-селектина (CD62P) и фосфатидилсерина выполняли с помощью многоцветной проточной цитометрии с использованием цитометрического

анализатора Navios (Beckman Coulter, Франция). Для выявления указанных маркеров применяли готовые наборы моноклональных антител от того же производителя - Annexin A5 FITC (фосфатидилсерин) и CD62P PE (P-селектин).

Морфологические исследования и контроль стерильности выполняли по аналогичной технологии как в случае с оценкой качества и безопасности КТ при холодном хранении в плазме и добавочном растворе SSP+.

2.3 Методика комбинированного хранения концентрата тромбоцитов

Настоящее исследование было посвящено комплексной оценке безопасности, метаболических параметров и агрегационной функции аферезных концентратов тромбоцитов при использовании комбинированного режима хранения: первоначально в термоконтейнере при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ с последующим переносом в медицинский холодильник. В работе использовались 10 доз тромбоцитов, полученных методом афереза на системе Trima Accel (Terumo BCT Inc., Бельгия) на базе ФГБУ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России. Отбор доноров и их медицинское обследование проводились в полном соответствии с требованиями российского законодательства в области донорства крови.

Для обработки клеточного материала после забора использовали автоматизированную систему Terumo TSCD-II (Terumo BCT Inc., Бельгия) совместно с магистральными наборами ВК 10-01 «ЛЛ» (Россия), что позволяло добавлять консервирующий раствор SSP+ в заданной пропорции (30% аутоплазмы к 70% консерванта). Полученные экспериментальные образцы (КТэ) помещали на пятидневное хранение в сертифицированный термоконтейнер «ТЕРМО-КОНТ МК» ТМ-8 (№ ФСР 2008/0388), оборудованный хладоэлементами МХД-1. Поддержание требуемого

температурного диапазона ($+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) обеспечивалось ежесуточной заменой охлаждающих блоков. На шестые сутки образцы перемещали в медицинский холодильник SANYO MBR-506D(H) (Япония), где они сохранялись при той же температуре до 10 суток. Контрольные образцы (КТк) на протяжении всего эксперимента находились в холодильном оборудовании.

В рамках исследования осуществлялся динамический контроль тромбограммы, метаболических параметров и агрегационной способности десяти доз экспериментального концентратов тромбоцитов (КТэ) в условиях комбинированного холодого хранения. Лабораторные исследования проводились в три этапа: исходно после заготовки материала, а также на пятый и десятый день хранения. Все применяемые медицинские изделия и расходные материалы имели соответствующую регистрацию в Российской Федерации.

Для выполнения диагностических тестов использовалось специализированное оборудование: гематологический анализатор Medonic M20 (Швеция) для оценки тромбограммы, анализатор ABL 800 FLEX (Дания) для биохимических исследований и определения кислотно-щелочного баланса, а также отечественный четырехканальный агрегометр АТ-2 с американскими реактивами CRONO-PAR® для изучения агрегационной функции тромбоцитов методом Борна.

Исследование проводилось с применением двух индукторов агрегации: аденозиндифосфата (АДФ) в конечной концентрации 5 мкМ и ристоцетина (1,1 мг/мл). Анализ агрегационной функции осуществлялся на основании измерения максимальной амплитуды агрегации, результаты выражались в процентном соотношении. Критерием включения доноров в исследование являлся уровень тромбоцитов в периферической крови $\geq 200 \times 10^9/\text{л}$. В ходе мониторинга оценивались динамические изменения основных тромбоцитарных показателей,

включая количественную концентрацию тромбоцитов (PLT, $\times 10^9/\text{л}$), тромбокрит (PCT, %), средний объем тромбоцитарных клеток (MPV, фл) и показатель гетерогенности популяции по объему (PDW, %).

Особое внимание уделялось оценке целостности мембран тромбоцитов путем анализа их реакции на ристоцетин. Важно отметить, что в данном контексте под "агрегацией" подразумевается именно агглютинация, обусловленная взаимодействием ристоцетина с рецептором GPIb на тромбоцитах и плазменным фактором Виллебранда. Этот механизм имитирует процессы адгезии к субэндотелиальным структурам. Примечательно, что для функционирования рецептора GPIb не обязательна его поверхностная экспрессия - он сохраняет активность даже в фиксированных формальдегидом клетках. Снижение ристоцетин-индуцированной агрегации может свидетельствовать о повреждении мембранной структуры тромбоцитов.

2.4 Определение ДНК-содержащих структур в концентратах тромбоцитов

В работе представлены результаты мониторинга ДНК-содержащих компонентов концентратов тромбоцитов при их хранении при температуре $+22 - 24^{\circ}\text{C}$. Материал для исследования получен от 25 здоровых доноров мужского пола (32 ± 2 года) с нормальными показателями тромбоцитов (307 ± 11 тыс/мкл) на базе ФГБУ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России. Программа обследования предусматривала анализ исходных образцов венозной крови до донации и исследование концентратов тромбоцитов в различные сроки хранения (1 час, 23 часа и 5 суток).

Для сравнительной оценки влияния температурных режимов хранения были дополнительно отобраны 15 доз КТ от доноров с аналогичными

характеристиками (средний возраст 31 ± 2 года, уровень тромбоцитов 313 ± 8 тыс/мкл). Каждая доза разделялась на две аликвоты: одна хранилась в условиях постоянного перемешивания при $+22 - 24^\circ\text{C}$, другая - в статическом режиме при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Подготовка образцов проводилась в строго асептических условиях. Концентраты тромбоцитов сначала переносили в стерильные мешки, затем разливали в микропробирки в операционной. После центрифугирования (4000 об/мин, 10 мин) отбирали 500 мкл супернатанта, который хранили при температуре $+24 - +26^\circ\text{C}$. Все этапы работы выполнялись с соблюдением требований стерильности.

Для количественного анализа ДНК-содержащих структур применяли оригинальный хромогенный метод, разработанный в Институте биоорганической химии РАН. Методика включала иммобилизацию гистона Н1.3 на планшетах Maxisorb с последующей 18-часовой инкубацией при $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Перед анализом проводили промывку планшетов забуференным физиологическим раствором (рН 7,4), а образцы предварительно разводили в 2% растворе бычьего сывороточного альбумина с последующим двукратным титрованием.

После двухчасовой инкубации при комнатной температуре использовали пероксидазный конъюгат гистона Н1.3, затем измеряли оптическую плотность при 450 нм на спектрофотометре iMarkTM. ДНК выделяли с помощью набора "Проба-НК-ФЕТ", а её количественное определение проводили на флуориметре Qubit 2.0 с использованием высокочувствительного набора dsDNA HS Assay Kit. Концентрацию нуклеосом, связанных с нейтрофильными внеклеточными ловушками, оценивали коммерческим ELISA-набором Nu.Q НЗ.1.

2.5 Математическая обработка результатов исследования

Статистический анализ для оценки качества и безопасности хранения концентратов тромбоцитов при низких температурах, в плазме и с добавлением раствора, был выполнен с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016. Рассчитывались статистические характеристики (средняя арифметическая, ошибка средней арифметической) и оценка значимости отличий.

Для анализа качества и безопасности холодного хранения тромбоцитных концентратов в опытном растворе с добавлением фумарата натрия и в растворе SSP+, статистический расчет был осуществлен в Microsoft Excel с использованием дополнения Real-Statistics от Чарльза Зайонца, с применением методов непараметрической статистики. Результаты исследования выражены через медиану с интерквартильным диапазоном (1Q-3Q). Статистический анализ включал попарное сравнение групп на каждом этапе наблюдения с использованием двустороннего непараметрического критерия Вилкоксона, проводимого как для внутригрупповых, так и межгрупповых сопоставлений. Порог статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$.

Обработка статистических данных исследования комбинированного хранения тромбоцитов выполнялась с помощью пакета SPSS 24.0. В представленных результатах указаны медианные значения с диапазоном между первым и третьим квартилями. Межгрупповые сравнения выполнялись с применением U-критерия Манна-Уитни, а для анализа динамики изменений внутри групп использовался критерий Вилкоксона в парных сравнениях. Статистическая значимость различий устанавливалась при уровне 0,05 ($p < 0,05$).

Статистическая обработка результатов исследования при оценке уровня ДНК-содержащих структур в концентратах тромбоцитов осуществлялась с использованием статистического пакета MedCalc (Version 15.8, Бельгия). Учитывая ограниченный объем выборки, для статистического анализа были применены непараметрические методы. Результаты представлены в формате медианы с интерквартильным диапазоном (М [25%; 75%]). Сравнительный анализ показателей при разных условиях и сроках хранения проводился с использованием парного критерия Вилкоксона.

**ГЛАВА 3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ
ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ В ПЛАЗМЕ И
ДОБАВОЧНОМ РАСТВОРЕ SSP+**

**3.1 Оценка показателей тромбограммы при холодном хранении КТ в плазме
и добавочном растворе**

Динамика изменений тромбоцитарных показателей на сроках наблюдения представлена в Таблице 3.

Таблица 3 – Изменение тромбоцитарных параметров при холодном хранении (M ± m)

Наименование показателей	Серии	Точки наблюдения, сутки			
		0	5	10	15
Количество тромбоцитов, ·10 ⁹ /л	Плазма	832,90 ± 51,22 (539–1081)	560,80 ± 96,84 (251–1207)	545,90 ± 83,04 (271–1130)	517,50 ± 45,28 (342–767)
	SSP+	832,60 ± 37,30 (688–1081)	797,20 ± 83,61 (267–1207)	789,60 ± 46,99 (499–1131)	701,70 ± 56,18 (431–1018)
Тромбокрит, %	Плазма	0,61 ± 0,03 (0,446–0,74)	0,38 ± 0,06 (0,16–0,57)	0,34 ± 0,04 (0,18–0,53)	0,39 ± 0,04 (0,24–0,56)
	SSP+	0,58 ± 0,04 (0,42–0,72)	0,58 ± 0,08 (0,20–0,88)	0,56 ± 0,05 (0,41–0,79)	0,48 ± 0,04 (0,30–0,71)
Средний объем тромбоцита, фл	Плазма	7,07 ± 0,26 (6,3–8,6)	7,08 ± 0,18 (6,5–8,3)	7,06 ± 0,14 (6,6–7,8)	7,25 ± 0,13 (6,7–7,9)

Продолжение Таблицы 3

Наименование показателей	Серии	Точки наблюдения, сутки			
		0	5	10	15
	SSP+	6,92 ± 0,24 (6,1–8,2)	7,16 ± 0,17 (6,5–8,2)	6,91 ± 0,16 (6,3–7,9)	6,93 ± 0,16 (6,3–7,8)
Ширина распределения тромбоцитов по объему, фл	Плазма	10,00 ± 0,29 (9,2–11,4)	10,03 ± 0,31 (9,2–11,9)	9,96 ± 0,21 (9,5–11,1)	10,28 ± 0,20 (9,5–11,3)
	SSP+	9,89 ± 0,33 (9,0–11,5)	10,07 ± 0,24 (9,1–11,3)	9,75 ± 10,9 (9,0–10,9)	9,79 ± 0,21 (9,0–11,0)

Исследования показали достоверные отличия в сохранности тромбоцитов при их хранении в КТ-плазме и КТ-SSP+. В обеих исследуемых группах отмечалось уменьшение числа тромбоцитов со временем. Отмечается статистически подтвержденное ($p < 0,05$) сокращение количества тромбоцитов в КТ-плазме на пятый день хранения до 69,7% от первоначального уровня (100 процентов), с дальнейшим убыванием на десятый день до 67,4% и на пятнадцатый день до 62,4%. Это подтверждает динамика изменения тромбокрита (63,9%→55,7%→47,5%) соответственно на 5, 10 и 15 дни наблюдения.

Средний объем тромбоцита (MPV) в КТ-плазма увеличивался к концу срока хранения ($7,07 \pm 0,26 \rightarrow 7,25 \pm 0,13$, $p > 0,05$), в КТ-SSP+ этот показатель увеличился к пятому дню хранения ($6,92 \pm 0,24 \rightarrow 7,16 \pm 0,17$, $p > 0,05$) с последующим возвращением к исходному уровню к концу срока наблюдения ($6,93 \pm 0,16$). Ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW) в обеих группах во время хранения изменялась незначительно.

В КТ-SSP+ падение числа клеток носило более равномерный характер (Рисунок 1). На пятый день хранения клеточность КТ-SSP+ составляла 95,7% от исходного (100%), на 10 день 94,8%, на 15 день 84,3%.

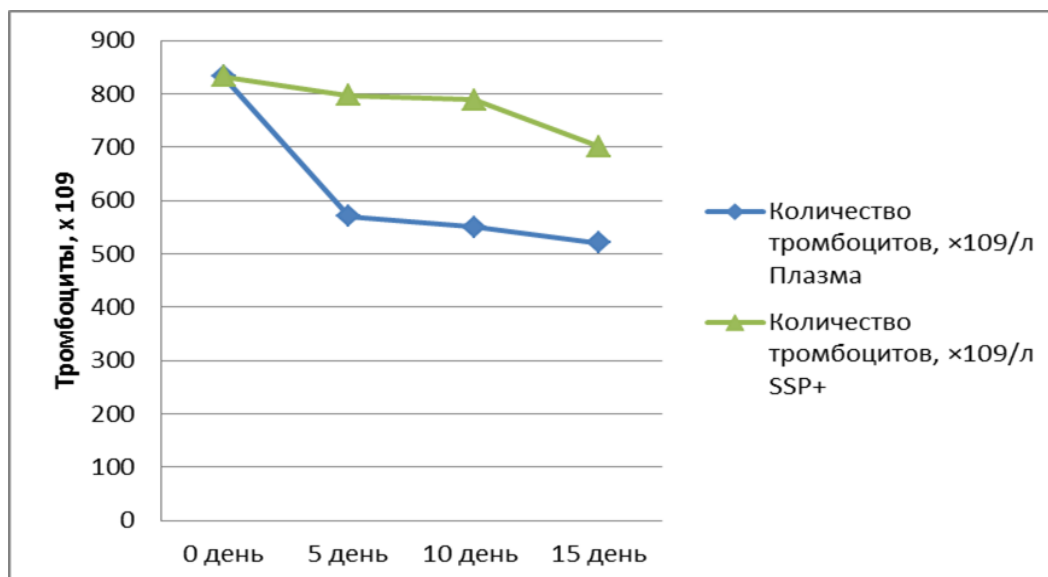


Рисунок 1 – Количество тромбоцитов ($10^9/\text{л}$) в плазме и SSP+ в процессе хранения

3.2 Оценка метаболической активности тромбоцитов в плазме и добавочном растворе

При помощи аппарата для исследования кислотно-основного и газового состава крови ABL-800 Radiometer (Дания) оценивались метаболические изменения в обеих группах во время хранения при низких температурах. Исследовали содержание бикарбоната, глюкозы, лактата, двуокиси углерода ($p\text{CO}_2$) и кислотно-основное состояние (Таблица 4).

С начала хранения и до 15-го дня было замечено постепенное убывание уровня $p\text{CO}_2$ в обеих исследуемых группах: в КТ-плазме он уменьшился с 50,5 до 37,8 мм рт. ст., а в КТ-SSP+ с 66,4 до 35,8 мм рт. ст. Обращает на себя

внимание устойчивостью уровня бикарбонатов в КТ-плазме на протяжении всего периода наблюдения, в то время как в КТ-SSP+ было зафиксировано их значительное понижение (с $28,9 \pm 2,7$ до $17,8 \pm 2,9$, $p < 0,01$). Снижение концентрации глюкозы со временем (Рисунок 2) соответствует увеличению уровня лактата (Рисунок 3).

Таблица 4 – Изменение показателей метаболизма при холодном хранении (M \pm m)

Показатели	Серии	Точка наблюдения, сутки			
		0	5	10	15
сНСО ₃ ⁻ , ммоль-л	плазма	$20,2 \pm 2,9$	$20,5 \pm 3,7$	$21,6 \pm 2,6$	$21,5 \pm 4,1$
	SSP+	$28,9 \pm 2,7$	$20,5 \pm 3,7$	$17,9 \pm 3,4$	$17,8 \pm 2,9$
рСО ₂ , мм рт.ст.	плазма	$50,5 \pm 8,4$	$40,2 \pm 8,1$	$38,5 \pm 6,4$	$37,8 \pm 6,9$
	SSP+	$66,4 \pm 7,4$	$42,5 \pm 8,1$	$33,9 \pm 6,5$	$35,4 \pm 5,8$
глюкоза, ммоль/л	плазма	$15,8 \pm 1,3$	$14,6 \pm 1,3$	$13,5 \pm 1,1$	$12,9 \pm 0,7$
	SSP+	$6,1 \pm 1,3$	$5,6 \pm 1,3$	$5,1 \pm 1,1$	$4,1 \pm 0,4$
лактат, ммоль/л	плазма	$1,38 \pm 0,23$	$3,06 \pm 0,13$	$4,64 \pm 0,15$	$6,06 \pm 0,33$
	SSP+	$0,87 \pm 0,14$	$2,66 \pm 0,15$	$3,81 \pm 0,19$	$4,80 \pm 0,33$
рН	плазма	$7,17 \pm 0,02$	$7,30 \pm 0,03$	$7,31 \pm 0,02$	$7,31 \pm 0,03$
	SSP+	$7,21 \pm 0,02$	$7,30 \pm 0,02$	$7,29 \pm 0,02$	$7,28 \pm 0,02$

Концентрация лактата в КТ-плазме возросла с $1,38 \pm 0,23$ ммоль/л до $6,06 \pm 0,33$ ммоль/л ($p < 0,05$), а в КТ-SSP+ — с $0,87 \pm 0,14$ ммоль/л до $4,80 \pm 0,33$ ммоль/л ($p < 0,05$). Расход глюкозы и образование лактата происходили в обеих группах на протяжении хранения с сопоставимой интенсивностью.

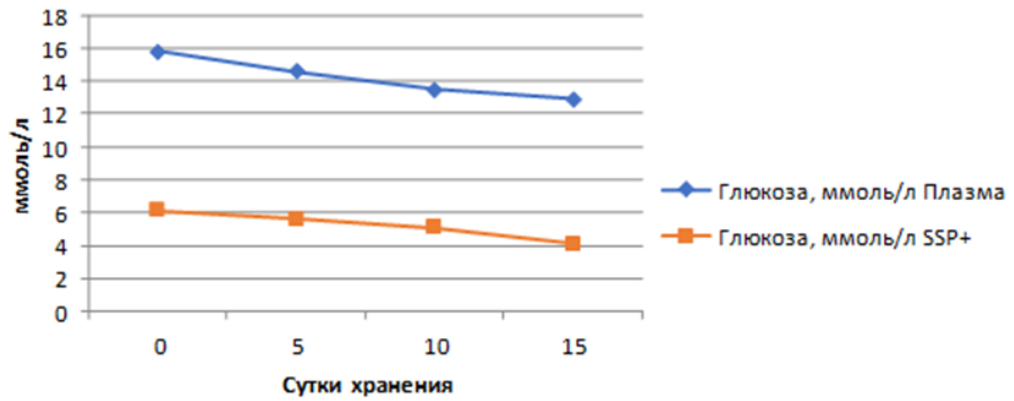


Рисунок 2 – Содержание глюкозы (ммоль/л) в плазме и SSP+ в процессе хранения

При этом отмечается относительно высокий уровень глюкозы в конце срока наблюдения, что свидетельствует о снижении уровня метаболизма. При хранении КТ-SSP+ в условиях комнатной температуры отмечается истощение запаса глюкозы примерно к седьмому дню, и к девятому дню хранения концентрация лактата увеличивалась с 6 до 14 ммоль/л, что позволяет судить о преимуществе режима холодового хранения КТ.

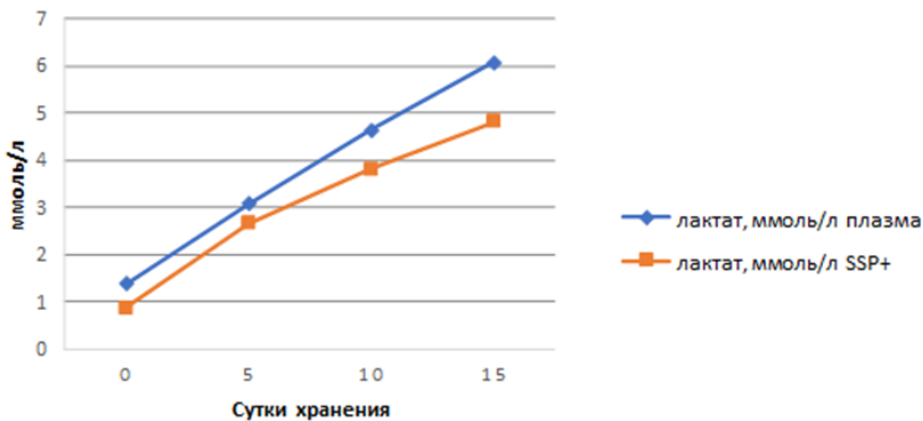


Рисунок 3 – Содержание лактата (ммоль/л) в плазме и SSP+ в процессе хранения

Как показано на Рисунке 4, рост значений рН после первых суток хранения указывает на сохранение достаточного буферного резерва. В течение пятидневного периода наблюдения уровень рН в обеих группах оставался стабильным, не демонстрируя значимых изменений. В группе с КТ-плазма показатель изменялся с $7,31 \pm 0,02$ до $7,31 \pm 0,03$, а в группе с КТ-SSP+ с $7,29 \pm 0,02$ до $7,28 \pm 0,02$, что указывает на адекватную буферную емкость используемых для хранения сред. Увеличение рН было связано с истощением глюкозы и продолжающимся окислением ацетата, в результате чего происходит производство бикарбоната и потребление ионов водорода.

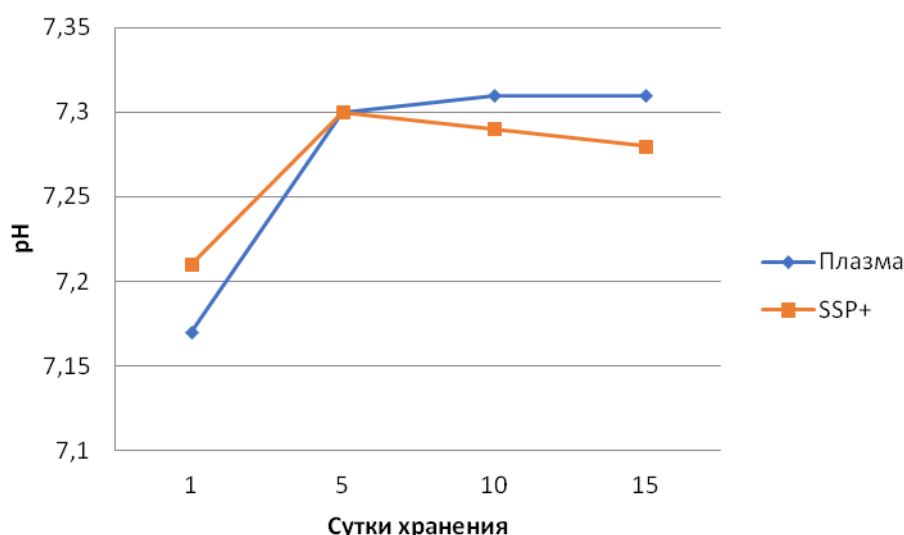


Рисунок 4 – Изменение рН в плазме и SSP+ в процессе хранения.

3.3 Морфология тромбоцитов при холодном хранении в плазме и добавочном растворе

В исследованных образцах определялись все морфологические типы тромбоцитов. В ходе исследования отмечались большие индивидуальные отличия, что может быть связано как с особенностями конкретных образцов,

так и с влиянием химических соединений при фиксации и окрашивании препаратов.

Выявлены следующие морфологические типы исследованных тромбоцитов:

1 тип – дискоциты, такие клетки также идентифицируют как «клетки покоя»;

2 тип – крупные тромбоциты округлой формы с гладкой или складчатой поверхностью;

3 тип – тромбоциты, не содержащие гранул и имеющие четко выраженные отростки (отросчатые тромбоциты); число визуально различимых отростков может достигать 10 на 1 тромбоцит;

4 тип – тромбоциты дегенеративного типа отличаются расширенной площадью поверхности, искаженной формой и присутствием объемных вакуолей в цитоплазме; эти клетки либо вовсе лишены гранул, либо имеют их крайне незначительное количество.

Морфологические типы тромбоцитов представлены на Рисунке 5.

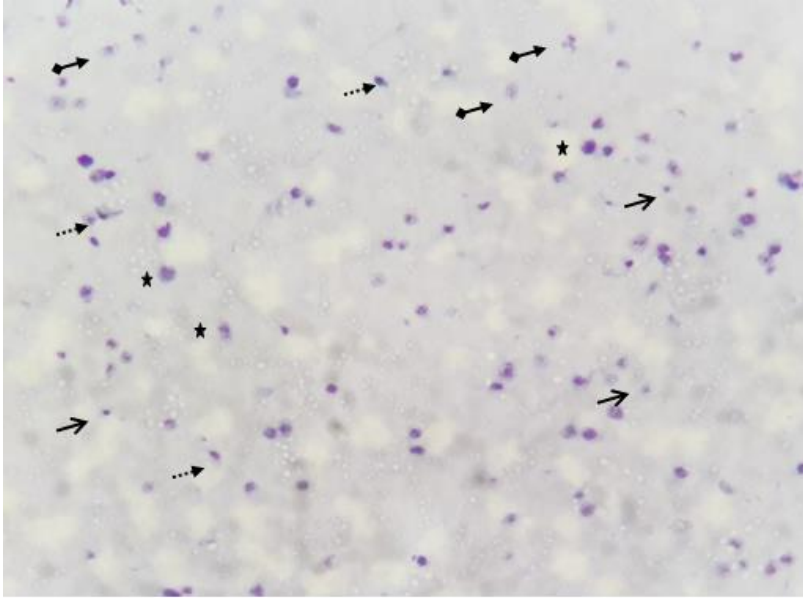


Рисунок 5 – Морфологические типы тромбоцитов

Примечания

- 1 → дискоциты (1 тип)
- 2 ★ большие округлые тромбоциты (2 тип)
- 3→ отросчатые тромбоциты (3 тип)
- 4 ↔ дегенеративные тромбоциты (4 тип)

Динамика количественного изменения морфологических типов тромбоцитов в процессе холодого хранения представлена в Таблице 5.

Таблица 5 – Морфологические типы тромбоцитов при холодогом хранении (M + m)

Показатели	Серии	Точка наблюдения, сутки			
		0	5	10	15
1 тип	плазма	7,05 ± 1,62	4,49 ± 1,59	4,18 ± 1,77	2,98 ± 3,3
дискоциты, %	SSP+	5,34 ± 1,60	4,92 ± 1,6	4,62 ± 2,71	3,13 ± 2,58

Продолжение Таблицы 5

Показатели	Серии	Точка наблюдения, сутки			
		0	5	10	15
2 тип большие округлые, %	плазма	66,27 ± 6,28	51,93 ± 13,13	38,98 ± 11,59	34,79 ± 12,21
	SSP+	64,78 ± 4,96	53,65 ± 10,46	38,42 ± 12,29	37,21 ± 10,61
3 тип Отросчатые, %	плазма	14,9 ± 4,95	23,8 ± 9,52	19,49 ± 4,95	18,45 ± 5,2
	SSP+	17,37 ± 4,77	22,98 ± 6,86	22,45 ± 5,48	22,13 ± 6,21
4 тип дегенеративные, %	плазма	11,79 ± 3,45	20,08 ± 6,66	38,09 ± 8,54	42,75 ± 10,20
	SSP+	12,39 ± 2,82	18,73 ± 5,32	36,43 ± 8,0	36,31 ± 8,55

Отмечается факт низкого содержания клеток 1 типа (дискоцитов) в начале хранения в обеих группах- КТ-плазма $7,05 \pm 1,62\%$, КТ-SSP+ $5,34 \pm 1,60\%$. Вместе с тем к концу срока наблюдения снижение количества дискоцитов в КТ-плазма было более выражено ($58,45\%$) по сравнению с КТ-SSP+ ($41,39\%$).

Отмечается преобладание на начальных сроках хранения клеток 2 морфологического типа как в КТ-плазма ($66,27 \pm 6,28\%$), так и в КТ-SSP+ ($64,78 \pm 4,96\%$).

В дальнейшем отмечено значимое снижение количества этих клеток к десятому дню хранения ($p < 0,05$) как в КТ-плазма, так и в КТ-SSP+. Процентное содержание клеток 3 типа к пятому дню хранения значимо ($p < 0,05$) нарастало в обеих группах, а затем существенно не изменялось ($p > 0,05$). Также отмечалось постоянное на каждом из сроков хранения нарастание количества клеток 4 типа как в КТ-плазма ($11,79 \pm 3,45 \rightarrow 42,75 \pm 10,20$, $p <$

0,05), так и в КТ-SSP+: $12,39 \pm 2,82 \rightarrow 36,31 \pm 8,55$, $p < 0,05$). Прирост дегенеративных форм в КТ-плазма составил 362,95%, в КТ-SSP+ 293,05%.

Полученные данные соответствуют литературным данным о трансформации дискоидной формы тромбоцита в сферическую в течение первых 24 часов холодового хранения [18; 20].

ГЛАВА 4. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ В ДОБАВОЧНОМ РАСТВОРЕ, СОДЕРЖАЩЕМ ФУМАРАТ НАТРИЯ, И РАСТВОРЕ SSP+

4.1 Оценка показателей тромбограммы КТ в добавочном растворе с фумаратом натрия и в растворе SSP+

Начальный уровень тромбоцитов в исследуемых образцах демонстрировал следующие значения: $916 \times 10^9/\text{л}$ (853-991,5) для группы ДРЭ против $1023 \times 10^9/\text{л}$ (902,5-1113,5) в группе ДР SSP+. Динамическая картина изменения численности тромбоцитов на различных этапах наблюдения графически представлена на Рисунке 6.

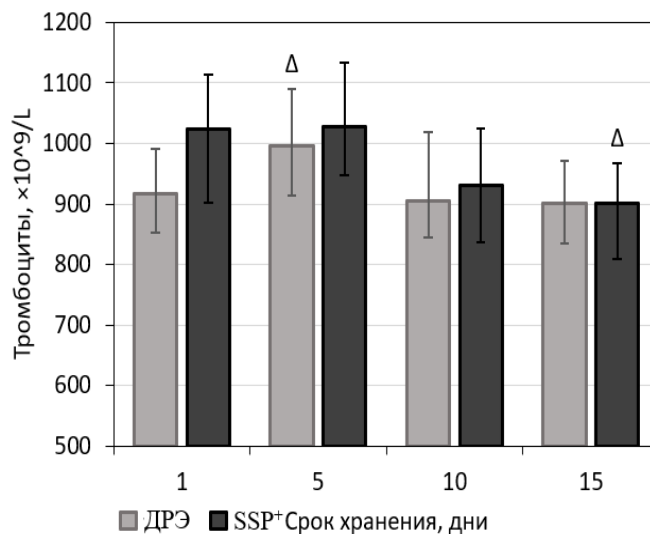


Рисунок 6 – Количество тромбоцитов в добавочных растворах ДРЭ и SSP+ в процессе хранения

Примечание: Δ $p < 0,05$ внутригрупповой парный тест Wilcoxon (сравнения данных с первым днём)

Результаты исследования показали характерную динамику изменения тромбоцитарных показателей при различных условиях хранения. К пятым суткам эксперимента в обеих группах отмечалось повышение количества тромбоцитов (PLT), что, вероятно, связано с явлениями агрегации и агглютинации клеток во время забора, потенциально обусловленными температурными факторами или составом консервирующих растворов. Этот феномен требует дальнейшего углубленного изучения.

В последующий период наблюдались существенные межгрупповые различия: в SSP+ к десятому дню и к окончанию исследования зафиксировано статистически значимое снижение PLT ($p < 0,05$), тогда как в ДРЭ количество клеток сохранялось на стабильном уровне. Суммарные потери тромбоцитов за весь период хранения составили 11% для SSP+ против всего 4% для ДРЭ.

Аналогичные закономерности выявлены при анализе тромбокрита (PCT). Начальное увеличение показателя к пятому дню, особенно выраженное в группе ДРЭ ($p < 0,05$), сменилось последующим снижением. Конечные значения продемонстрировали минимальные колебания PCT в ДРЭ при значительном (10%) уменьшении в SSP+.

Параллельно зарегистрирован прогрессирующий рост среднего объема тромбоцитов (MPV) в обеих группах, достигший статистической значимости на пятые сутки в SSP+ ($p < 0,05$, Рисунок 7). К завершению эксперимента отмечалось умеренное увеличение MPV, соответствующее естественному процессу клеточного старения, при сохранении всех значений в пределах физиологической нормы [11].

Исследование гетерогенности тромбоцитарной популяции по параметру PDW показало устойчивый рост вариабельности клеточных размеров в обеих группах на протяжении всего периода хранения. Полученные данные

свидетельствуют о постепенном формировании неоднородной клеточной популяции, включающей как увеличенные формы тромбоцитов, так и продукты их деструкции, что объективно отражает прогрессирующие морфологические изменения при продолжительном хранении.

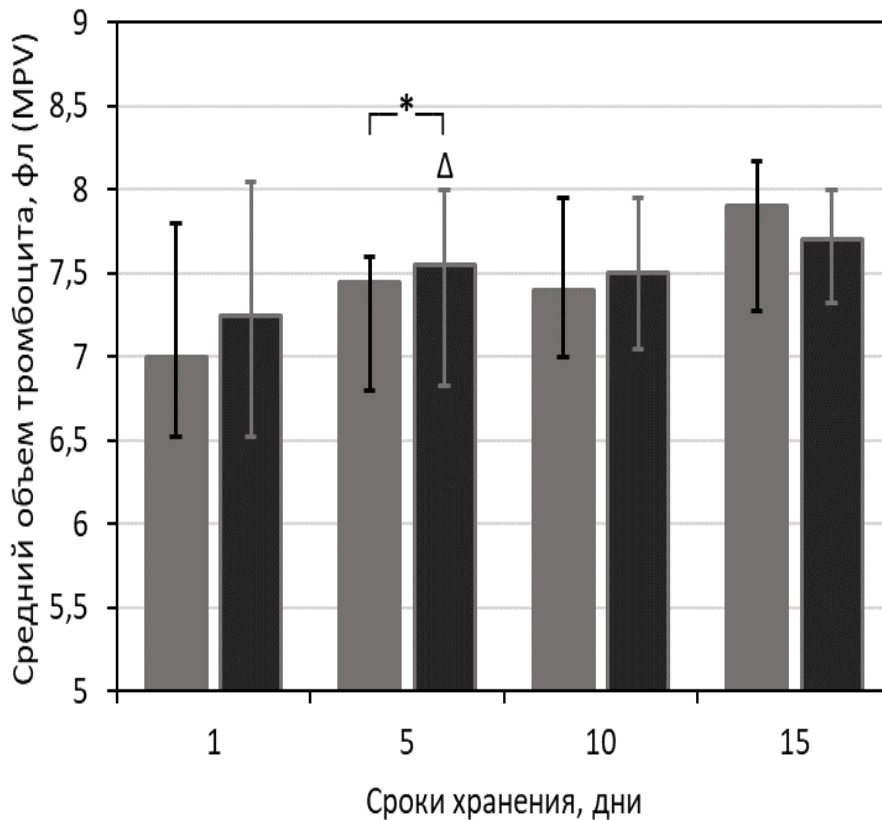


Рисунок 7 – Изменение среднего объема тромбоцитов в добавочных растворах ДРЭ и SSP+ в процессе хранения

(Примечания: Δ $p < 0,05$ внутригрупповой парный тест Wilcoxon (сравнения данных с первым днём); * $p < 0,05$ межгрупповой парный тест Wilcoxon (сравнение групп в день наблюдения)).

4.2 Метаболическая активность тромбоцитов в разных добавочных растворах

Анализ изменений показателей метаболизма также выявил в обеих группах однонаправленный характер изменений, происходящих во время холодового хранения. Исследовалось содержание глюкозы, лактата и кислотно-основное состояние.

На начальном этапе исследования концентрация глюкозы в образцах обеих групп была практически одинаковой, составляя в среднем 6,4 ммоль/л (диапазон 6,2-6,7) для ДРЭ и 6,7 ммоль/л (диапазон 6,2-6,7) для SSP+, без статистически значимых различий ($p > 0,05$). В процессе хранения наблюдалось прогрессирующее снижение уровня глюкозы в обеих группах на всех временных точках исследования ($p < 0,01$) Рисунок 8). Начиная с пятого дня хранения, между группами появились различия: в пробах с SSP+ концентрация глюкозы стабильно превышала показатели ДРЭ, и эта тенденция сохранялась до конца периода наблюдения. К примеру, на пятый день испытаний концентрация глюкозы в ДРЭ снизилась до 4,9 ммоль/л (размах 4,4–5,3), тогда как для SSP+ она снизилась до 5,4 ммоль/л (размах 4,9–5,9) ($p < 0,05$). К завершению 10-дневного периода хранения было зафиксировано статистически значимое различие в концентрации глюкозы между группами: в ДРЭ показатель достиг 3,0 ммоль/л (2,23-3,75), тогда как в SSP+ сохранялся на уровне 4,0 ммоль/л (3,27-5,15) ($p < 0,01$). Конечные значения продемонстрировали выраженное снижение до 1,05 ммоль/л (0,1-2,58) в ДРЭ и 2,25 ммоль/л (0,8-4,05) в SSP+ ($p < 0,01$). Анализ динамики потребления глюкозы выявил, что в ДРЭ было утилизировано 83% исходного количества субстрата, в то время как в SSP+ - 67%.

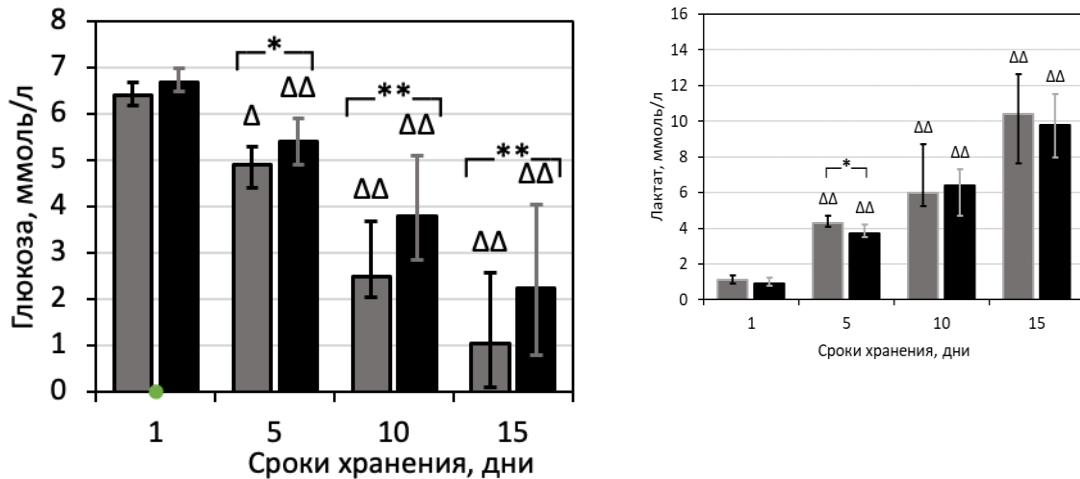


Рисунок 8 – Изменение содержания глюкозы и лактата в добавочных растворах ДРЭ и SSP⁺ в процессе хранения

(Примечания: Δ $p < 0,05$ внутригрупповой парный тест Wilcoxon (сравнения данных с первым днём); * $p < 0,05$ межгрупповой парный тест Wilcoxon (сравнение групп в день наблюдения)).

Первоначальный уровень лактата в ДРЭ сохранялся на уровне 1,1 ммоль/л (диапазон 0,9–0,35), что статистически не различалось с показателями в SSP⁺, где он составлял 0,9 ммоль/л (диапазон 0,8–1,25). Значимые различия между группами обнаружили на пятый день хранения ($p < 0,05$). Последующие измерения отметили заметный рост уровня лактата в обеих группах ($p < 0,01$), при этом в ДРЭ концентрация возросла с 4,3 ммоль/л (диапазон 4,1–4,7) до 7,05 ммоль/л (диапазон 5,47–8,8), а затем до 10,4 ммоль/л (диапазон 7,63–12,63). Для SSP⁺ эти значения увеличились с 3,7 ммоль/л (диапазон 3,5–4,2) до 6,55 ммоль/л (диапазон 5,28–7,3) и в конечном итоге до 9,8 ммоль/л (диапазон 7,95–11,53). На 10-е и 15-е сутки хранения значимых различий в уровне лактата между группами не наблюдалось. Данное явление связано с исчерпанием резервов фумарата натрия в консервирующем растворе, что вызвало угнетение митохондриального дыхания в тромбоцитах. Интенсивное накопление лактата на фоне активного потребления глюкозы указывает на доминирование

гликолитического типа энергетического обмена в тромбоцитах, обработанных с использованием добавочного раствора [16]. К завершению экспериментального периода в группе ДРЭ зафиксирован 713% рост концентрации лактата, тогда как в SSP+ этот показатель достиг 781%.

Мониторинг кислотно-щелочного баланса выявил характерную динамику изменений рН в процессе хранения КТ (Рисунок 9). Первоначальная стабильность показателей (до 5 суток) в обеих группах свидетельствует об эффективной работе буферных систем. Последующее снижение рН коррелировало с накоплением лактата, причем наиболее выраженные изменения отмечались в группе ДРЭ (конечное значение $7,12 \pm 0,04$ против $7,15 \pm 0,04$ в SSP+), что может указывать на различия в метаболической активности клеток при использовании разных консервирующих растворов. Важно отметить, что на протяжении всего времени хранения уровень рН оставался выше минимально допустимой отметки в 6,4, что свидетельствует о достаточных компенсаторных возможностях буферных систем обоих добавочных растворов.

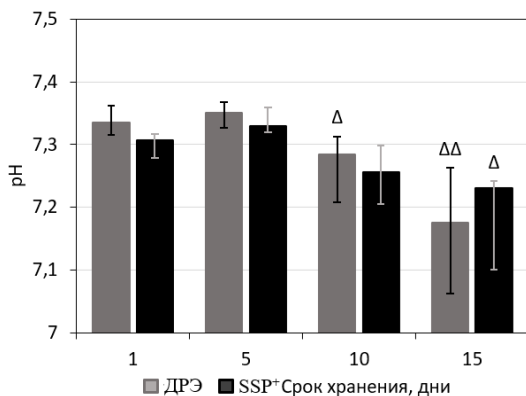


Рисунок 9 – Изменение рН в процессе хранения тромбоцитов в ДРЭ и SSP+ (Примечание: Δ $p < 0,05$ внутригрупповой парный тест Wilcoxon (сравнения данных с первым днём)).

Регистрируемые величины глюкозы ($1,0 \pm 0,4$ ммоль/л в ДРЭ и $1,8 \pm 0,4$ ммоль/л в SSP+) и лактата ($11,0 \pm 0,9$ ммоль/л в ДРЭ и $10,3 \pm 0,8$ ммоль/л в SSP+) свидетельствуют о том, что метаболическая деятельность остается на прежнем уровне. Метаболический процесс в тромбоцитах по пути гликолиза включает превращение глюкозы в молочную кислоту, а также выделение ионов водорода, углекислоты и воды, что при недостаточной буферизации приводит к падению pH. Благодаря наличию бикарбоната в плазме, который эффективно буферизует среду с тромбоцитами, pH сохраняется в пределах регламентированного диапазона в течение установленного срока годности КТ. К тому же ацетат, содержащийся в дополнительном растворе SSP+, может участвовать в метаболизме через цикл окислительного фосфорилирования, способствуя дополнительной нейтрализации ионов водорода и повышая буферную способность [20].

4.3 Гемостатический потенциал тромбоцитов

Для определения коагуляционной активности КТ применяли тромбоэластографический анализ, включающий три основных параметра: МА (максимальная амплитуда, мм) - показатель конечной плотности сгустка, R (время реакции, мин) - индикатор латентного периода свертывания, и G (прочность сгустка, градусы/сек) - комплексный параметр, характеризующий структурные свойства фибриновой сети [24].

Результаты исследования показали, что показатель МА сохранял стабильные значения в течение всего периода наблюдения. Аналогично, параметр G не выявил значимых различий между группами ($p > 0,05$) и оставался неизменным при хранении. Увеличение времени R (с 12,4 до 17,3

минут в ДРЭ и с 13,2 до 16,9 минут в SSP+) вероятно связано с деградацией плазменных белков при длительном хранении при $+4\pm 2^\circ\text{C}$ (Рисунок 10).

Для верификации этой гипотезы проводили эксперимент с добавлением тромбоцитодеплетированной донорской плазмы (IV, Rh-) к хранившимся образцам в соотношении 1:1. Введение плазмы нормализовало показатели коагуляции: в группе ДРЭ время R сократилось с 17,30 до 11,75 минут, в SSP+ - с 16,9 до 11,45 минут на 15-е сутки хранения (Таблица 6).

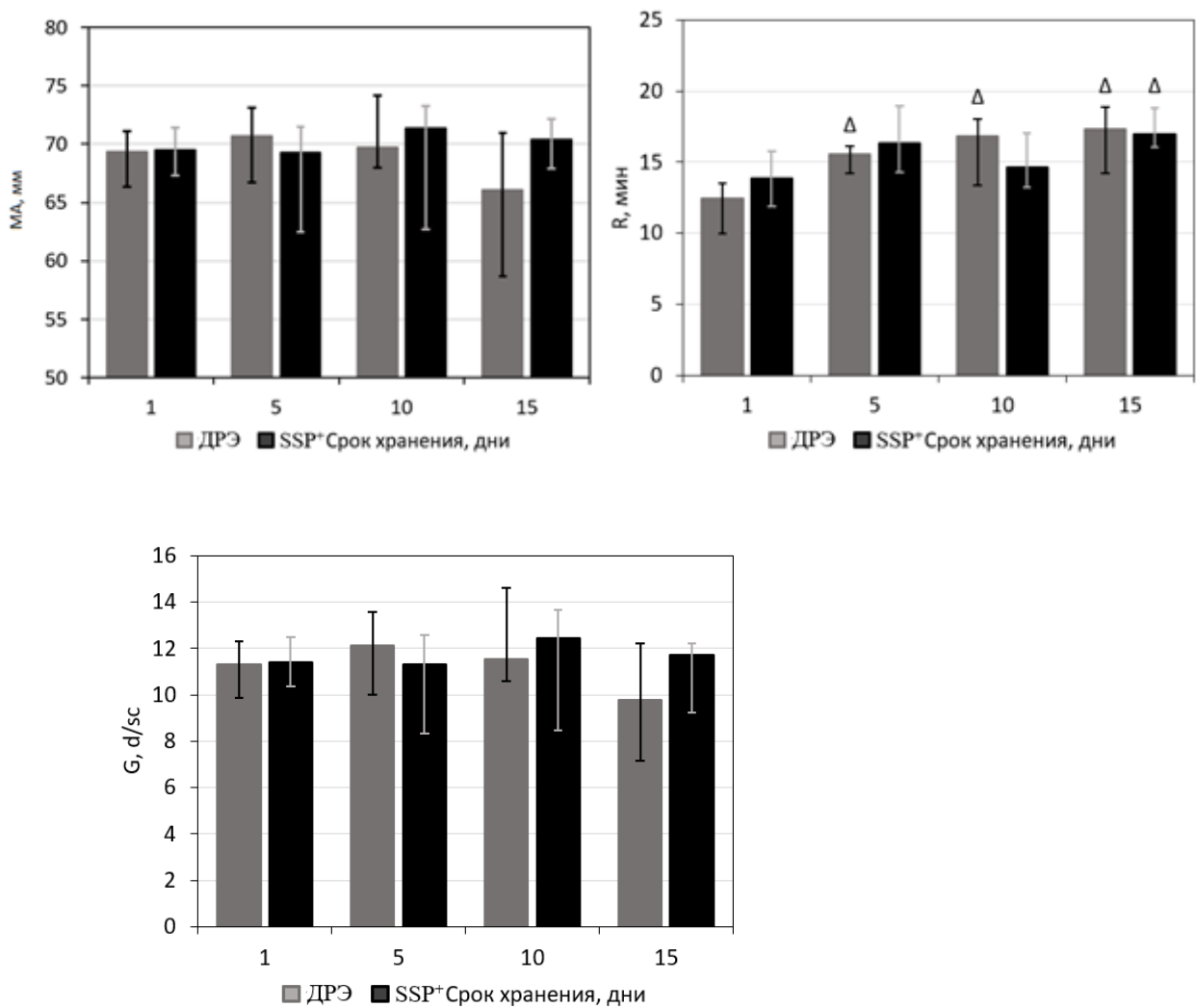


Рисунок 10 – Параметры тромбоэластограммы КТ в добавочных растворах с фумаратом и SSP⁺ на различных сроках холододового хранения

Таблица 6 – Параметры тромбоэластограммы на 1-й и 15 день хранения

Серия	Срок хранения	Параметры тромбоэластограммы. Медиана (Q1–Q3)		
		R (мин)	МА (мм)	G (d/sc)
донорская плазма		26,3 (19,8–32,8)*	22,6 (20,5–23,2)*	1,5 (1,3–1,5)*
SSP ⁺	1-е сутки	13,2 (10,55–14,7)	70,45 (67,35–72,75)	11,9 (10,35–13,35)
	15-е сутки	16,9 (16,0–19,2) [#]	69,7 (64,5–70,7)	11,5 (9,1–12,0)
SSP ⁺ + донорская плазма (1:1)	1-е сутки	12,95 (11,35–15,55)	71,90 (70,70–73,20)	12,80 (12,10–13,70)
	15-е сутки	11,45 (11,25–12,25)	64,10 (61,45–67,25)	8,90 (7,95–10,30)
ДРЭ	1-е сутки	12,4 (9,8–13,8)	69,3 (66,3–71,3)	11,3 (9,8–12,4)
	15-е сутки	17,30 (13,95–19,00) [#]	66,05 (58,20–71,10)	9,75 (7,00–12,30)
ДРЭ + донорская плазма (1:1)	1-е сутки	13,90 (11,40–16,50)	70,00 (69,20–72,75)	11,65 (11,25–13,50)
	15-е сутки	11,75 (11,30–12,20)	69,50 (66,35–71,05)	11,40 (9,90–12,25)

Примечание:

* $p < 0,05$ – значимость отличий между донорской плазмой и КТ

[#] $p < 0,05$ – значимость отличий R с 1-м днем хранения

4.4 Оценка активационной способности и апоптоза тромбоцитов

Анализ экспрессии маркеров активации тромбоцитов (фосфатидилсерина и Р-селектина) не показал существенных межгрупповых различий ($p > 0,05$) на всех этапах исследования. Тем не менее, в обеих группах наблюдалась четкая динамика увеличения этих показателей по мере продления срока хранения.

В группе SSP+ количество тромбоцитов, экспрессирующих аннексин V, демонстрировало волнообразную динамику: максимальный рост в 3,36 раза к 5-м суткам, с последующим снижением на 10-е сутки (в 1,2 раза) и новым увеличением до 3,48 раза к 15-му дню. В группе ДРЭ изменения были более плавными с коэффициентами увеличения 1,36, 1,06 и 1,17 на соответствующие сроки.

Аналогичная картина наблюдалась для CD62P: в SSP+ отмечались выраженные колебания (рост в 1,67, 1,44 и 2,14 раза), тогда как в ДРЭ изменения происходили постепенно (1,01, 1,16 и 1,54 раза). К 15-м суткам в обеих группах зафиксировано статистически значимое увеличение содержания CD62P+ тромбоцитов ($p < 0,05$): с 11,90% до 25,52% в SSP+ и с 17,07% до 26,33% в ДРЭ (Рисунок 11).

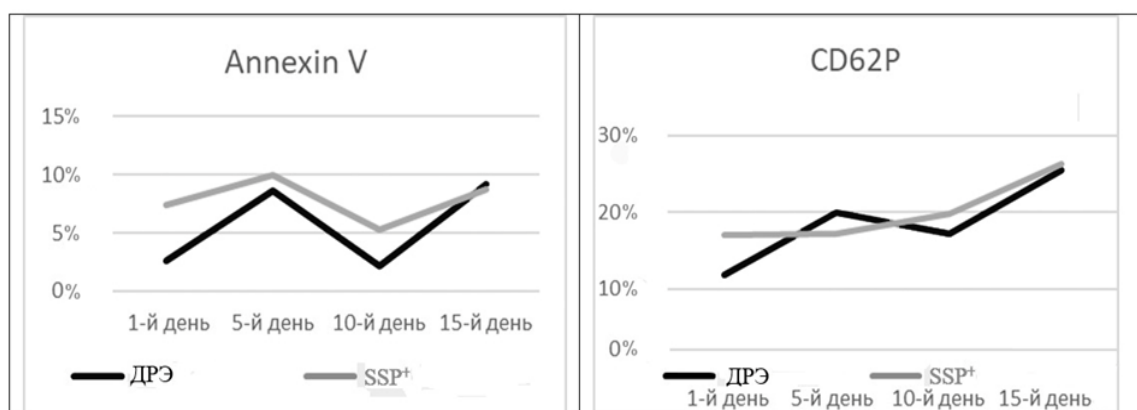


Рисунок 11 – Изменение относительного содержания аннексин V⁺ и CD62P⁺ тромбоцитов в добавочных растворах ДРЭ и SSP⁺ в процессе хранения

4.5 Морфология тромбоцитов при использовании добавочного раствора с фумаратом натрия и в растворе SSP+

Изменения в численности различных морфологических форм тромбоцитов в период холодого хранения представлены в Таблице 7. Во

время проводимого исследования проанализировали распределение тромбоцитов по четырем морфологическим типам (1–4), указав их процентное содержание относительно общего числа тромбоцитов, наблюдаемых в поле зрения. Концентрация клеток в компоненте крови не оценивалась.

Таблица 7 – Морфологические типы тромбоцитов при холодном хранении ($M \pm m$)

Раствор	Точка наблюдения, сутки	Морфологический тип тромбоцитов			
		дискоциты 1 тип	большие округлые 2 тип	отросчатые 3 тип	дегенеративные 4 тип
SSP ⁺	1	14,67 ± 1,91	58,09 ± 2,83	18,77 ± 2,11	8,47 ± 0,98
	5	35,47 ± 2,16	40,83 ± 2,29	14,88 ± 1,68	8,83 ± 1,06
	10	37,20 ± 2,71	40,06 ± 2,35	13,79 ± 1,82	8,95 ± 1,05
	15	36,00 ± 3,62	42,09 ± 2,35	12,49 ± 1,71	9,41 ± 0,99
ДРЭ	0	16,23 ± 1,31	60,27 ± 1,51	15,91 ± 1,37	7,60 ± 0,62
	5	40,80 ± 2,82	42,01 ± 2,61	11,29 ± 1,03	5,90 ± 0,66
	10	40,37 ± 3,33	40,61 ± 2,54	10,62 ± 1,28	8,41 ± 0,98
	15	43,05 ± 3,06	39,65 ± 2,02	11,61 ± 2,03	5,70 ± 0,67

На первом сроке во всех растворах преобладают тромбоциты 2 типа (большие округлые) 60,27% в ДРЭ и 58,09% в SSP⁺. В дальнейшем их доля снижается: на 5 день 42,01% в ДРЭ, 40,83% в SSP⁺; на 10 день 40,61% в ДРЭ, 40,06% в SSP⁺; на 15 день 39,65% в ДРЭ, 42,09% в SSP⁺.

Процентное соотношение дискоцитов увеличивается по срокам во всех группах: в день заготовки 16,23% в ДРЭ, 14,67% в SSP⁺; на 5 день 40,80% в

ДРЭ, 35,47% в SSP⁺; на 10 день 40,37% в ДРЭ, 37,2% в SSP⁺; на 15 день 43,05% в ДРЭ, 36,00% в SSP⁺.

Содержание дегенеративных форм (3–4 типа) на первом сроке хранения (0 день) составляло 23,51% в ДРЭ, 27,24% в SSP⁺. На последующих сроках количество дегенеративных форм 3 и 4 морфологических типов сокращалось: на 5 день 17,19% в ДРЭ, 23,71% в SSP⁺; на 10 день 19,03% в ДРЭ, 22,74% в SSP⁺; на 15 день 17,31% в ДРЭ, 21,9% в SSP⁺.

Дегенеративные формы элиминируются в первые дни хранения, и в дальнейшем оставшиеся тромбоциты стабильны в своем морфофункциональном состоянии до конца срока наблюдения.

Использование ДРЭ и SSP⁺ показало сходные результаты в распределении тромбоцитарных морфологических типов (1–4), наблюдаемые на различных интервалах времени хранения (Рисунок 12).

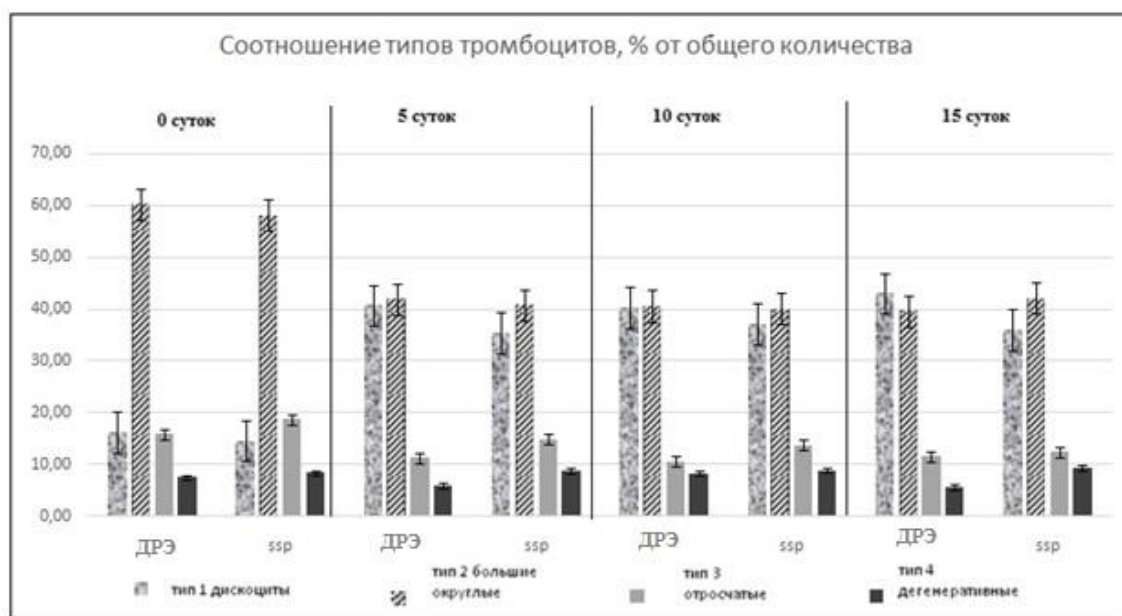


Рисунок 12 – Гистограмма распределения тромбоцитов по морфологическим типам в группах с добавочными растворами SSP⁺ и ДРЭ на разных сроках хранения (примечание – данные представлены в виде $M \pm m$)

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ХОЛОДОВОМ ХРАНЕНИИ

5.1 Моделирование варианта транспортировки КТ совместно с эритроцитной взвесью

Для моделирования транспортировки концентрата тромбоцитов совместно с эритроцитами были воссозданы условия, максимально приближенные к реальной логистике гемокомпонентов. В эксперименте использовались два контейнера с 300 мл физиологического раствора, имитирующие стандартные упаковки с эритроцитной взвесью (Рисунок 13).

Контроль температурного режима проводился с применением сертифицированного терморегистратора ТИ-2-"Т-конт МК" (№ свидетельства о поверке 79949-20). Полученные данные о колебаниях температуры в течение 24-часового периода представлены на Рисунке 14.



Рисунок 13 – Термоконтейнер медицинский многоразовый с пассивными аккумуляторами холода ТМ - «ТЕРМО-КОНТ МК» в исполнении ТМ-8

Аналогичным вариантом транспортировки является мобильный термоконтейнер для транспортировки биологических материалов, позволяющий мониторить температуру онлайн за счет встроенного терморегистратора (патент на полезную модель №205364 от 12.07.2021 г.).

5.2 Оценка показателей КТ при комбинированном хранении

Исходная концентрация тромбоцитов в исследуемых образцах составила $836,5 (759,5-923,8) \times 10^9/\text{л}$ для экспериментальной группы (КТэ) и $1023 (893,0-1135,0) \times 10^9/\text{л}$ для контрольной группы (КТк). К пятым суткам хранения существенных изменений количества тромбоцитов в обеих группах не наблюдалось. Однако к завершению исследования было зафиксировано статистически значимое снижение: на 9,1% ($p=0,009$) в контрольной группе и на 13,2% ($p=0,012$) в экспериментальной.

Параметры среднего объема тромбоцитов демонстрировали незначительную тенденцию к увеличению: в КТэ с 7,45 (6,85-7,825) фл до 7,55 (6,6-7,7) фл, в КТк с 7,3 (6,5-8,125) фл до 7,35 (6,95-8,05) фл ($p>0,05$). Отмеченные изменения имели одинаковую направленность и не коррелировали с применяемым методом хранения (Рисунок 15).

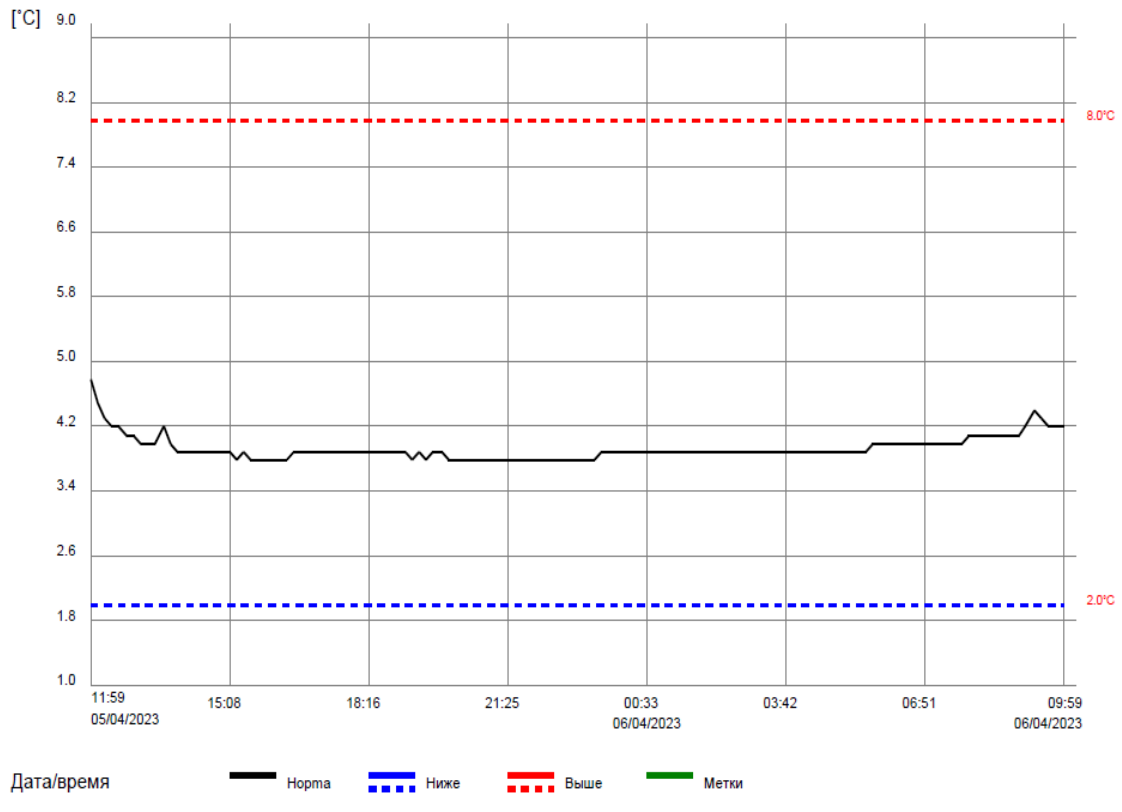


Рисунок 14 – Динамика суточной температуры с помощью терморегистратора-индикатора порогового ТИ-2 «Т-конт МК».

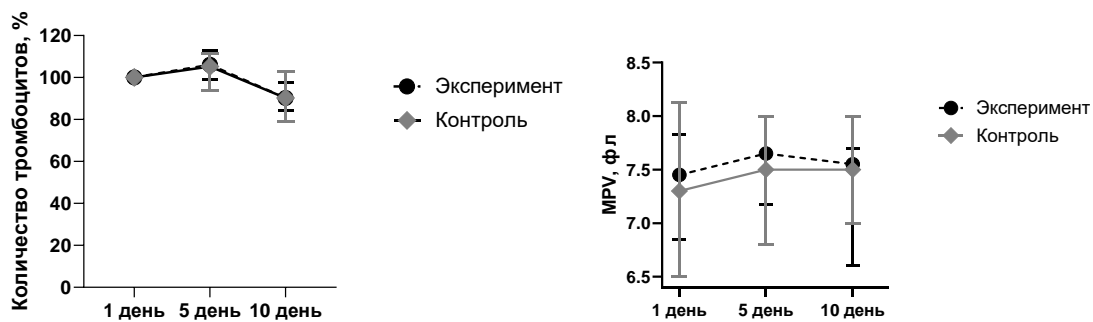


Рисунок 15 – Изменение количества тромбоцитов (исходная концентрация принята за 100%) и среднего объема тромбоцитов (MPV) при комбинированном и постоянном гипотермическом хранении в течение 10 дней

Однако обнаруженные вариации в размерах тромбоцитов соответствовали уровням, которые считаются нормой для организма. Динамика изменений уровня тромбокрит (PCT) была похожей. К пятому дню исследования показатели PCT увеличивались в обеих исследуемых группах, однако затем наблюдался их снижение, при этом в группе КТэ, снижение было статистически значимым ($p = 0,007$). Показатель гетерогенности тромбоцитов по объему (PDW) оценивался по данным гистограммы, отражая вариабельность размеров клеточной популяции. В ходе исследования не было выявлено существенных изменений PDW в сравниваемых группах, за исключением статистически значимого снижения данного параметра в экспериментальной группе (КТэ) к концу срока хранения ($p = 0,008$). Наблюдаемая стабильность показателей среднего объема тромбоцитов (MPV) и ширины их распределения (PDW) в процессе хранения подтверждает безопасность применяемого низкотемпературного режима. Важно подчеркнуть, что зарегистрированное снижение клеточной численности во всех случаях соответствовало допустимым пределам, установленным нормативными требованиями. Результаты исследования продемонстрировали сходную динамику снижения уровня глюкозы при стандартном ($+4 \pm 2^\circ\text{C}$) и комбинированном методах хранения: в контрольной группе от 6,7 (6,35-7,1) до 4,0 (3,025-5,25) ммоль/л ($p=0,001$), в экспериментальной - от 7,1 (6,3-7,35) до 5,25 (4,85-6,15) ммоль/л ($p=0,005$). Аналогичная динамика наблюдалась при оценке уровня лактата: в контрольной группе его содержание возросло с 0,9 (0,675-1,325) до 6,55 (4,175-7,625) ммоль/л ($p=0,001$), тогда как в экспериментальной группе - с 0,75 (0,5-0,9) до 4,45 (3,725-4,75) ммоль/л ($p=0,005$). Анализ парциального давления CO_2 выявил разнонаправленные изменения: в контроле отмечался незначительный рост показателя с 11,9 (8,15-24,8) до 27,1 (20,45-33,6) мм рт.ст. ($p=0,249$), в то время как в экспериментальной группе зафиксировано существенное снижение с 11,2 (10,325-12,825) до 3,15 (2,975-3,75) мм рт.ст. ($p=0,005$). Концентрация глюкозы

на пятые сутки хранения в термоконтейнере достигала 5,9 (5,6-6,775) ммоль/л, не отличаясь статистически от контрольных значений 5,5 (4,825-6,0) ммоль/л и обеспечивая достаточный энергетический субстрат для поддержания митохондриальной активности.

Важно отметить, что комбинированный метод хранения характеризовался менее интенсивным потреблением глюкозы ($p=0,023$) и накоплением лактата ($p=0,012$) к десятому дню. Показатели рН оставались в физиологических пределах (7,25-7,49) при обоих режимах хранения, с незначительным повышением к пятым суткам (до 7,32 в контроле и 7,39 в эксперименте), что свидетельствует о достаточной компенсационной возможности буферных систем. На всех этапах оценки значение рН не опускалось ниже допустимого критического уровня ($pH \geq 6,4$) [24; 25]. Концентраты тромбоцитов сохраняли оптимальные показатели кислотно-щелочного баланса, демонстрируя соответствие качественным стандартам на протяжении 10-дневного периода наблюдения. Исходные значения рН (7,25-7,49) оставались стабильными в обеих исследуемых группах в течение всего срока хранения, что подтверждает безопасность и функциональную сохранность компонентов (Рисунок 16).

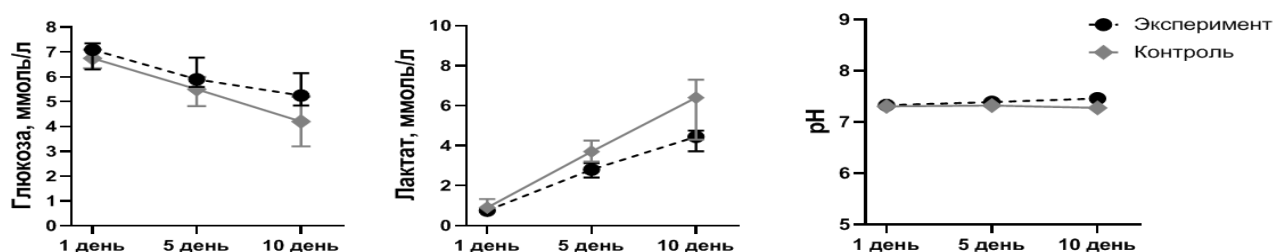


Рисунок 16 – Метаболические изменения КТ, происходящие в условиях хранения в холодильнике (контроль) и при комбинированном хранении (эксперимент)

В процессе хранения в обеих исследуемых группах было зафиксировано статистически значимое снижение агрегационной способности тромбоцитов в ответ на стимуляцию АДФ, достигавшее максимальных значений к окончанию эксперимента. Первоначально максимальная амплитуда агрегации (МА) в контрольной группе превышала показатели экспериментальной: 32,4% (20,55-45,15) против 23,35% (12,7-39,2) соответственно.

К пятым суткам хранения различия между группами нивелировались: значения МА составили 16,4% (10,8-22,75) в контроле и 15,4% (9,15-36,25) в эксперименте ($p=0,815$). Однако к десятому дню в контрольной группе зарегистрировано более выраженное падение агрегационной активности до 12,5% (5,85-14,9; $p=0,001$), тогда как в экспериментальной группе данный показатель оставался достоверно выше - 8,85% (7,275-27,175; $p=0,009$). Визуальное представление динамики изменений агрегационной функции приведено на Рисунке 17.

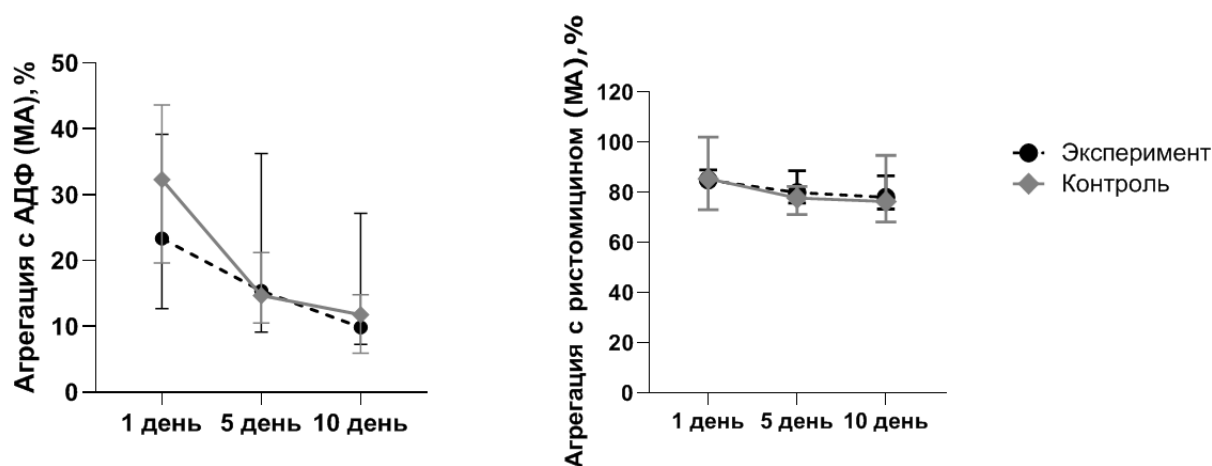


Рисунок 17 – Динамика агрегационной активности тромбоцитов под действием АДФ и ристомина при хранении в холодильнике (контроль) и

комбинированном хранении (эксперимент). МА (%) – максимальная амплитуда агрегации тромбоцитов

Исходные показатели максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов (МА) были сопоставимы между группами: 85,4% (74,91-101,2) в контроле и 85,2% (83,3-89,9) в эксперименте. К десятому дню хранения значения МА сохранялись на уровне 76,35% (68,78-92,5) в контрольной группе и 78,9% (73,6-87,4) в экспериментальной, без статистически значимых межгрупповых различий на всех этапах исследования. Отмечается, что реакция на ристомидин демонстрировала равномерное снижение агрегационной активности в обеих группах, в то время как ответ на АДФ характеризовался более выраженным уменьшением показателей в первые пять дней хранения. При этом общая степень снижения агрегации оставалась незначительной, что свидетельствует о сохранении структурной целостности мембран тромбоцитов при обоих режимах хранения.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА УРОВНЯ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУР В КОНЦЕНТРАТАХ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ХРАНЕНИЯ

Исходная концентрация ДНК-содержащих частиц в крови доноров до забора КТ равнялась 658 (101; 951) нг/мл, тогда как сразу после приготовления гемокомпонента она возросла до 1001 (308; 2663) нг/мл. Хранение КТ при комнатной температуре ($+22 \pm 2^\circ\text{C}$) привело к значительному повышению уровня ДНК: за первые сутки – до 4277 (2741; 6319) нг/мл, а к пятым суткам – до 13182 (7572; 59464) нг/мл (Рисунок 18).

Анализ вкДНК после экстракции ДНК из образцов КТ показал достоверное повышение её концентрации на первые и пятые сутки хранения по сравнению с исходным уровнем сразу после приготовления трансплантата (Таблица 8)

В ходе исследования оценивалось содержание ДНК-содержащих структур при различных температурных условиях хранения. Наибольшая концентрация таких частиц наблюдалась при соблюдении стандартного температурного режима хранения ($+22 \pm 2^\circ\text{C}$) с постоянным перемешиванием - к пятым суткам хранения в этих условиях концентрация ДНК существенно превышала показатели, полученные при хранении при $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ (Рисунок 19).

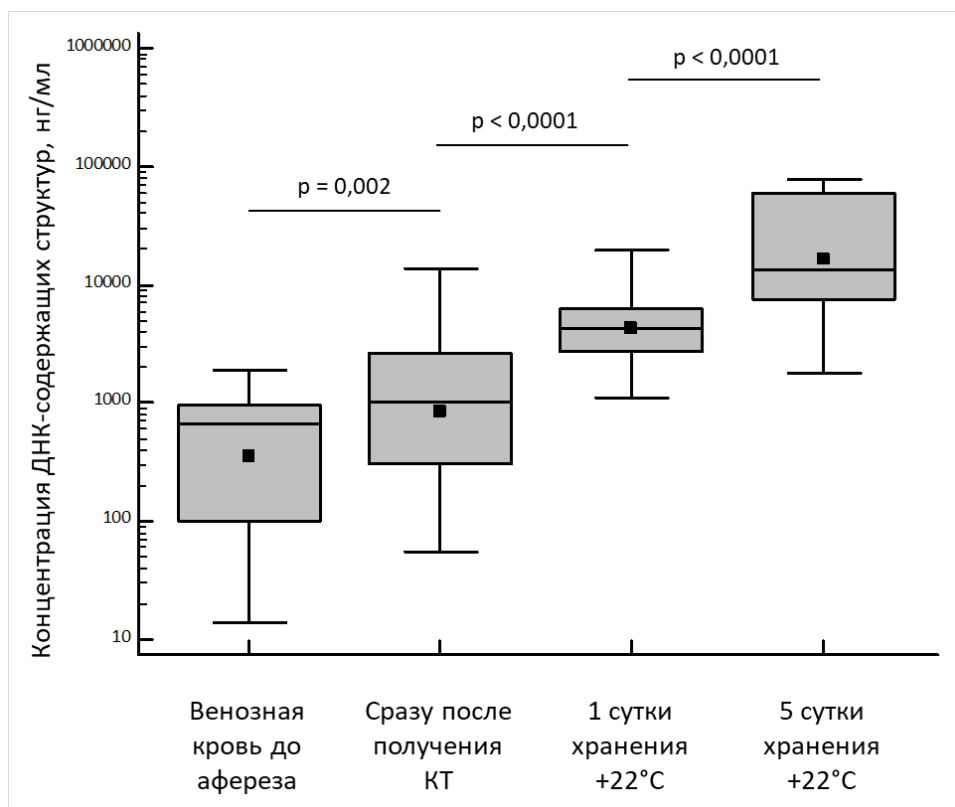


Рисунок 18 – Концентрация ДНК-содержащих структур при хранении концентрата тромбоцитов в условиях комнатной температуры (+22°C) в течении пяти суток (n=25)

Таблица 8 – Концентрация вкДНК в образцах КТ при хранении в условиях комнатной температуры (n=10)

	Венозная кровь до афереза	Сразу после получения КТ	1 сутки хранения	5 сутки хранения
Концентрация ДНК, нг/мл. М [25%; 75%]	67 (64; 79)	60 (42; 71)	82 (69; 106) *	158 (131; 194) **

* $p=0,002$ относительно сразу после получения ТК; ** $p=0,002$ относительно 1 сутки хранения +22 °С

Полученные данные выявили существенное нарастание количества ДНК-содержащих элементов в концентратах тромбоцитов при их хранении в стандартных температурных условиях. Максимальный рост концентрации был зарегистрирован в начальный пятидневный период, достигая пиковых значений на 1-е и 5-е сутки эксперимента (Рисунок 19).

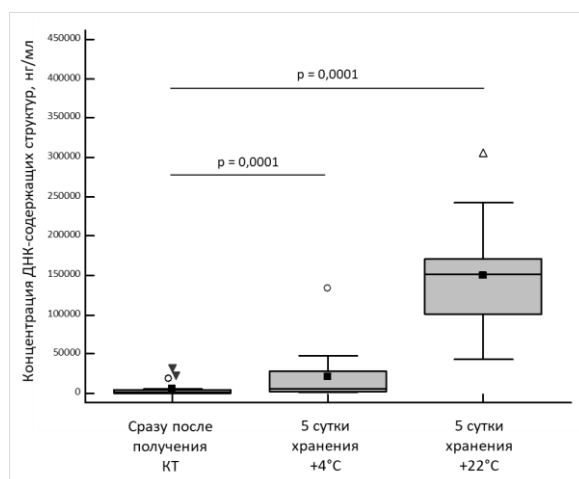
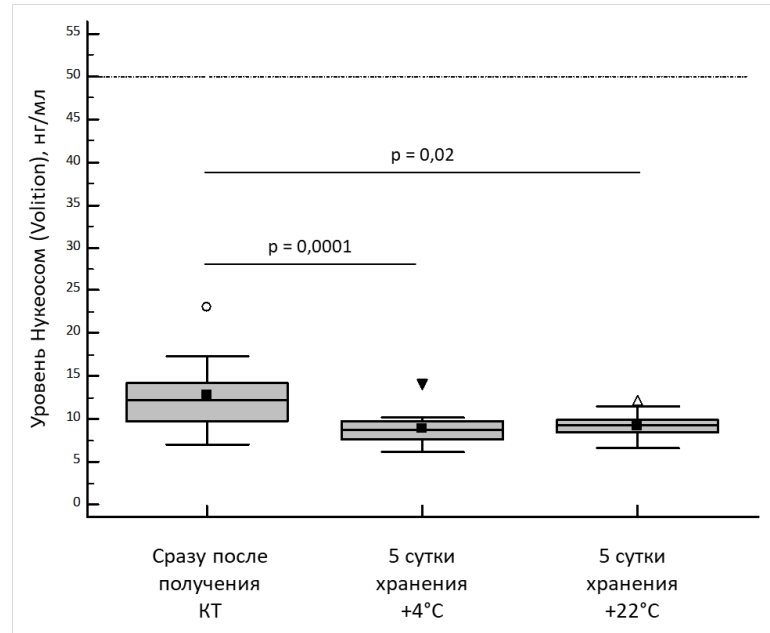


Рисунок 19 – Концентрация ДНК-содержащих структур при хранении концентрата тромбоцитов в различных условиях хранения в течении пяти суток (n=15)

Исследование продемонстрировало стабильно низкий уровень нуклеосомных маркеров NETs во всех группах КТ, не превышающий пороговое значение 50 нг/мл при любых условиях хранения (Рисунок 20). Динамический анализ выявил характерную закономерность: пиковые показатели отмечались в свежезаготовленных образцах с последующим достоверным снижением к концу пятидневного периода наблюдения.

Для подтверждения нейтрофильного происхождения свободной ДНК был проведен дополнительный анализ методом детекции нуклеосом, специфичных для процесса нетоза. Полученные значения (менее 50 нг/мл) свидетельствуют: об отсутствии значимой нейтрофильной контаминации в образцах КТ, а также о

высокой эффективности процедуры лейкоредукции на этапе заготовки материала.



Пунктирная линия на графике обозначает нижний порог референсных значений нормы, заданных производителем.

Рисунок 20 – Уровень нуклеосом в продуктах КТ при хранении в различных температурных условиях в течении пяти суток (n=15)

Исследование включало параллельное использование двух методик количественного определения ДНК в концентратах тромбоцитов: хромогенного прямого детектирования, не требующего подготовки проб, и метода с предварительной экстракцией нуклеиновых кислот специализированными наборами.

Оба подхода достоверно зафиксировали присутствие ДНК и выявили закономерное нарастание её концентрации в ходе хранения. При этом результаты экстракционного метода систематически демонстрировали

заниженные (на несколько порядков) значения по сравнению с прямым анализом. Данное расхождение обусловлено, во-первых, неизбежными потерями биоматериала при процедуре выделения, во-вторых, превосходящей аналитической чувствительностью прямого детектирования, исключающего дополнительные манипуляции с пробой.

Полученные результаты убедительно свидетельствуют о преимуществе прямого хромогенного метода, обеспечивающего более точную и воспроизводимую оценку содержания ДНК-содержащих компонентов в клеточных трансплантатах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования выявили существенные различия в сохранности тромбоцитов при длительном холодном хранении в плазме и добавочном растворе SSP+. Наибольшая эффективность была продемонстрирована при использовании раствора SSP+, содержащего ионы калия, магния и фосфата, по сравнению с традиционным хранением в 100% плазме.

Анализ тромбограммы подтвердил соответствие полученных данных с литературными источниками. В рамках сравнительного исследования оценивались изменения в концентратах тромбоцитов (30% плазма/70% SSP+) при двух температурных режимах: холодном ($+4^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) и комнатной температуре в течение 21 дня [115]. На 14-е сутки хранения наблюдалось снижение количества клеток на 15 - 18%, а к окончанию эксперимента - на 30 - 35% от исходных значений. При этом статистически значимых различий между температурными режимами по количественным показателям тромбоцитов выявлено не было.

Многочисленные исследования свидетельствуют, что пролонгированное хранение концентратов тромбоцитов в добавочных растворах сопровождается увеличением среднего объема тромбоцитов (MPV), который признан важным индикатором клеточного старения [129, 225]. Физиологический диапазон среднего объема тромбоцитов (MPV) составляет 7,4-10,54 фл, при этом отмечается возрастзависимый рост данного показателя. Интересно, что более молодые тромбоциты характеризуются относительно большим объемом по сравнению со зрелыми формами [19]. В рамках проведенного нами исследования средний объем тромбоцитов (MPV) в концентрате тромбоцитов, хранящихся в плазме, увеличивался (с $7,07 \pm 0,26$ до $7,25 \pm 0,13$, $p > 0,05$), тогда как в концентрате тромбоцитов в добавочном растворе SSP+ этот показатель

сохранялся неизменным. Зафиксированные колебания размеров тромбоцитов при обоих вариантах хранения оставались в пределах нормы. Однако абсолютные значения MPV в тромбоцитах, хранившихся в SSP+, во все исследуемые периоды были ниже, чем в тромбоцитах, хранящихся в плазме. Эти результаты говорят о замедлении старения тромбоцитов при использовании добавочного раствора SSP+ в условиях холодного хранения. Показатель PDW (ширина распределения тромбоцитов по объему), рассчитываемый по данным гистограммы распределения клеток, количественно характеризует степень вариабельности размеров тромбоцитов в популяции (уровень тромбоцитарного анизоцитоза). Наблюдавшаяся в ходе нашего исследования стабильность PDW и MPV (среднего объема тромбоцитов) может служить косвенным подтверждением удовлетворительной толерантности тромбоцитов к условиям холодного хранения.

Потребности тромбоцитов в энергии поддерживаются двумя метаболическими путями-анаэробным гликолизом и кислородзависимым окислительным фосфорилированием, в результате чего аденозинтрифосфат (АТФ) синтезируется более эффективно путем окислительного фосфорилирования [71]. В период хранения *ex vivo* активность гликолитического пути приводит к уменьшению количества глюкозы и накоплению молочной кислоты, что вызывает снижение уровня pH из-за недостатка буферной способности. Однако бикарбонат, содержащийся в плазме, способен эффективно нейтрализовать изменения кислотности, обеспечивая поддержание оптимального уровня pH в КТ на протяжении всего стандартного периода годности концентрата тромбоцитов [93]. Присутствующий в составе SSP+ ацетат способен метаболизироваться посредством окислительного фосфорилирования, создавая дополнительную буферную емкость благодаря потреблению ионов водорода [49, 97, 149].

При анализе метаболической активности было установлено, что тромбоциты сохраняли свою метаболическую функцию на протяжении всего периода исследования (15 дней), вне зависимости от используемой среды хранения – в плазме или в добавочном растворе SSP+. При этом температура хранения составляла $+4 \pm 2^\circ\text{C}$, и уровень pH оставался в пределах нормативно установленных значений. Применение плазмозамещающего раствора SSP+ в холодных условиях хранения способствовало сохранению стабильности кислотно-основного состояния (КОС) в КТ, несмотря на истощение бикарбонатного буфера и интенсивную продукцию лактата. Следовательно, реальный дефицит буферных оснований не развивается, при этом суммарная емкость буферной системы компенсирует дефицит мощности бикарбонатной буферной системы и перекрывает его.

Полученные данные совпадают с исследованием хранения КТ-SSP+ при регламентированной температуре $+22 \pm 2^\circ\text{C}$ и постоянном помешивании. В процессе хранения КТ-SSP+ при этом температурном режиме, несмотря на возрастающую продукцию лактата, значения pH увеличивались [12; 33].

С учетом особенностей работы буферных систем добавочного раствора SSP+ было установлено, что в этой среде показатель pH во все сроки наблюдения соответствовал допустимым значениям (не менее 6,4) [24].

Результаты морфологического исследования показали последовательные изменения в структуре тромбоцитов при холодном хранении во всех анализируемых группах. Внедрение добавочного раствора SSP+ и использование исключительно плазмы выявляют аналогичные тенденции в распределении тромбоцитов по разным морфологическим категориям (типам с 1 по 4) на протяжении различных интервалов времени хранения. Хранение в растворе SSP+ способствует более успешному сохранению дискоцитной формы тромбоцитов и уменьшает количество дегенеративных форм, в сравнении с

хранением исключительно в плазме. При сравнении показателей концентратов тромбоцитов, заготовленных на добавочных растворах (ДРЭ и SSP+) и хранящихся в условиях пролонгированного холодого режима (при температуре $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 15 суток), результаты соответствовали регламентированным нормативным национальным и международным стандартам показателей качества и безопасности гемокомпонентов.

При анализе тромбограммы не выявлено существенных различий между использованием нового экспериментального добавочного раствора с добавлением фумарата натрия и раствора SSP+. Стоит отметить, что показатели, необходимые для оценки качества и безопасности, оставались в рамках установленных стандартов согласно регулирующей документации на момент окончания периода наблюдения. Согласно научным данным, продолжительное хранение концентратов тромбоцитов в добавочных растворах приводит к постепенному увеличению среднего объема тромбоцитов (MPV). Данный феномен рассматривается как морфологический маркер клеточного старения [137, 212]. Физиологический диапазон MPV составляет 7,4-10,54 фл, при этом отмечается положительная динамика данного показателя в процессе хранения. Важно отметить, что более крупные размеры характерны для молодых форм тромбоцитов [129].

Стабильность MPV (средний объем тромбоцита) и PDW (ширина распределения тромбоцитов), наблюдаемая во время нашего эксперимента, свидетельствует о хорошей переносимости холодого хранения. Уменьшение количества клеток не выходило за пределы значений, указанных в нормативных документах.

Известно, что разные условия хранения могут отразиться на метаболических процессах в тромбоцитах, влияя на кислотно-щелочной баланс среды [129].

В результате оценки метаболической активности выявлено, что независимо от среды хранения (ДРЭ или SSP+) тромбоциты сохраняли метаболическую активность при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение всего периода наблюдения (15 суток), не выходя за пределы регламентированных значений pH. Применение добавочных растворов в холодových условиях хранения обеспечивало стабильность кислотно-основного состояния (КОС) в КТ, несмотря на истощение бикарбонатного буфера и интенсивную продукцию лактата. Это говорит о том, что реальный дефицит буферных оснований при холодovом режиме хранения не развивается, при этом суммарная емкость буферной системы компенсирует дефицит мощности бикарбонатной буферной системы и перекрывает его.

Полученные данные в целом совпадают с исследованием хранения КТ в SSP+ при регламентированной температуре $+22 \pm 2^\circ\text{C}$ и постоянном помешивании [157].

С учетом особенностей работы буферных систем использованных добавочных растворов важно отметить, что в данных средах показатель pH во все сроки наблюдения соответствовал допустимым значениям (не менее 6,4) [24].

Изученные параметры тромбоэластограммы указывают на то, что тромбоциты, находящиеся на хранении с использованием добавочного раствора, в независимости от характера этого раствора (ДРЭ или SSP+) и в дальнейшем длительно хранящиеся при пониженной температуре, способны к восстановлению своих гемостатических свойств. Если у пациента сохранилась достаточная активность плазменных компонентов системы гемостаза, переливание концентрата тромбоцитов, хранящегося в условиях гипотермии, может компенсировать недостаток тромбоцитарных мембран, которые играют важную роль в активации свертывания крови.

В процессе сбора, переработки и хранения тромбоциты подвергаются активации, что сопровождается значимыми изменениями в их морфологии и функциях. Этот процесс характеризуется высвобождением содержимого внутриклеточных гранул и перемещением веществ, которые прежде были внутри, на внешнюю оболочку тромбоцитов. Так, например, молекула Р-селектина (CD62P) обычно находится в альфа-гранулах тромбоцитов и может оказаться на их поверхности в ходе активации. Анализ наличия мембранного Р-селектина в жидкой части тромбоцитного концентрата применяется, чтобы отслеживать уровень активации тромбоцитов [27; 198].

Согласно полученным данным, 21-дневное хранение концентратов тромбоцитов при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ не вызывало изменений в экспрессии маркера активации CD62P, демонстрируя стабильность данного показателя во всех исследуемых образцах [180]. Однако сравнительный анализ выявил существенные различия в зависимости от температурного режима: при комнатной температуре ($+22^\circ\text{C}$) наблюдалось значительное повышение количества тромбоцитов, экспрессирующих активационные маркеры CD62P и CD63, в то время как холодное хранение обеспечивало существенно более низкий уровень их экспрессии [114].

Активация тромбоцитов сопровождается перемещением фосфатидилсерина из внутреннего слоя мембраны на её поверхность, что позволяет ему связываться с аннексином V - наиболее достоверным маркером апоптоза. Усиленная экспрессия фосфатидилсерина указывает на процессы клеточного старения и апоптоза, демонстрируя прогрессирующие изменения в тромбоцитах при хранении. Эти изменения могут быть частично связаны с их активацией во время процедуры выделения. Связывание аннексина V, являясь индикатором экспонированного фосфатидилсерина, коррелирует с повышением прокоагулянтной активности таких тромбоцитов [142]. Согласно

исследованиям, использование специальных добавок в консервирующих растворах при низкотемпературном хранении уменьшает количество аннексин V-позитивных тромбоцитов по сравнению с хранением в чистой плазме [116].

Результаты исследования показали отсутствие статистически значимых различий в экспрессии фосфатидилсерина и P-селектина между концентратами тромбоцитов, хранившимися в экспериментальном растворе с фумаратом натрия и стандартном растворе SSP+ на всех этапах наблюдения. Отмечалось увеличение числа клеток с фиксацией аннексина V и CD62P в обеих группах с достижением статистически значимых различий лишь к 15 дню хранения. Однако при сохранении схожей тенденции, отмечался менее выраженный темп прироста активации клеток, хранящихся на экспериментальном растворе на основе фумарата натрия.

Таким образом, продолжительное хранение тромбоцитов в дополнительном растворе эффективнее оберегает их от активации и апоптоза в отличие от хранения в растворе SSP+.

При использовании ДРЭ и SSP+ получены также сходные результаты в морфологической картине тромбоцитов. Изменения, выявленные в ходе исследования, подчеркивают систематический характер морфологических изменений при хранении в условиях пониженной температуры во всех исследуемых выборках. При этом пребывание в ДРЭ в условиях холодого хранения способствует более эффективному сохранению дискоцитов и снижению числа дегенерированных форм по сравнению с использованием SSP+ на протяжении всего периода хранения.

Транспортировка донорской крови и ее компонентов крови, осуществляемая в течение менее 30 мин, может производиться с использованием транспортных контейнеров, обеспечивающих достаточную

изотермичность. Необходимо обеспечить отдельную транспортировку пригодных для использования донорской крови и (или) ее компонентов, требующих разной температуры хранения. Если компоненты не предназначены для немедленного лечебного применения, то они должны быть помещены в медицинское оборудование для хранения.

Транспортировка донорской крови и ее компонентов во временном интервале более 30 мин должна осуществляться в специальных транспортных термоизоляционных контейнерах с соблюдением санитарно-гигиенических требований при условии обеспечения сохранности продукта.

По действующим нормативным документам РФ при транспортировке допускается хранение концентрата тромбоцитов без помешивания до 24 часов. Зарубежными учеными проведены исследования по изменению качества тромбоцитов при 24- или 30-часовом периоде отсутствия перемешивания между 2-м и 3-м днем хранения путем помещения в стандартный изотермический транспортный контейнер при комнатной температуре [24]. По результатам исследования выявлено, что прерывание перемешивания на 24 или 30 часов в различной степени влияло на свойства тромбоцитов *in vitro*. После пятого и седьмого дней хранения уровень рН и количество клеток соответствовали требованиям качества после 24 часов без перемешивания. После 30 часов без перемешивания на пятый и седьмой день хранения отмечено снижение уровня рН до 6,2 [216].

Проведенные исследования подтвердили возможность успешного использования двухэтапного гипотермического хранения КТ с последовательным перемещением из термоконтейнера в медицинский холодильник. Важно отметить, что даже к завершению срока хранения сохранялись клинически значимые уровни метаболической активности и

функциональных характеристик клеток. Данная технология комбинированного температурного режима открывает новые перспективы для рационализации системы хранения тромбоцитов и усовершенствования транспортной логистики гемокомпонентов.

Такие результаты свидетельствуют о том, что изменения при транспортировке и хранении КТ в термokonтейнере вместе с эритроцитсодержащими компонентами с последующим хранением в медицинском холодильнике сопоставимы с непрерывным хранением в холодильнике, что является важным шагом в определении пригодности холодовых тромбоцитов в качестве трансфузионной среды.

Результаты исследования содержания ДНК-содержащих структур в концентратах тромбоцитов показали существенное возрастание их концентрации к первым и пятым суткам хранения в стандартных условиях. В качестве вероятных источников ДНК в КТ могут выступать нейтрофильная ДНК при активации нетоза с образованием внеклеточных ловушек, а также митохондриальная ДНК тромбоцитов.

Особый интерес представляет митохондриальная ДНК тромбоцитов, которая, согласно данным ПЦР-анализа [46], является основным источником ДНК-содержащих структур. Её накопление связано с процессами активации, апоптоза и деструкции тромбоцитов при хранении.

Повышенный уровень ДНК в КТ после заготовки по сравнению с исходной венозной кровью объясняется активацией и повреждением тромбоцитов во время центрифугирования, что согласуется с литературными данными [15]. Статистически значимое увеличение нуклеосом в свежеприготовленных КТ подтверждает клеточную активацию при сепарации крови. Сравнительный анализ температурных режимов хранения выявил

существенно меньшее накопление ДНК-содержащих структур при +4°C, что свидетельствует о подавлении клеточной активации, лучшей сохранности клеток, а также о снижении процессов деградации.

ВЫВОДЫ

1. Хранение концентратов тромбоцитов в плазме приводит к значительному снижению количества тромбоцитов уже на пятый день хранения при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ до 69,7% от исходного уровня в сравнении с 95,7% при хранении с использованием добавочного раствора, при стабильном уровне рН и глюкозы, что позволяет обеспечить более выраженную сохранность тромбоцитов при использовании раствора SSP+.

2. Изменения в допустимом снижении количества тромбоцитов в группах ДРЭ и SSP+ (4% против 11%) и потребления глюкозы (83% против 67%), а также изменения уровня рН (3% против 2%) свидетельствует о поддержке метаболической активности клеток в течение всего периода хранения.

3. Результаты морфологического анализа продемонстрировали различное влияние сред хранения на состояние тромбоцитов. Хранение в плазме приводило к более выраженным изменениям: увеличение дегенеративных форм на 363% (против 293% в SSP+) и уменьшение дискоцитов до 58,5% (против 41,4% в SSP+), что свидетельствует об интенсификации процессов клеточного старения. Однако при сравнении SSP+ с раствором, содержащим фумарат натрия, подобных различий в морфологической трансформации тромбоцитов обнаружено не было.

4. При хранении концентратов тромбоцитов при комнатной температуре ($+20^\circ\text{C}$ до $+24^\circ\text{C}$) значительно (в 28 раз) возрастает концентрация внеклеточных ДНК-содержащих структур, в то же время, хранение при температуре $+4 \pm 2^\circ\text{C}$ позволяет замедлить этот процесс, обеспечивая лучшую сохранность клеток и снижая риск их повреждения.

5. Использование комбинированного хранения концентратов тромбоцитов при транспортировке в термоконтейнере с функцией постоянного измерения температуры с дальнейшим перемещением для хранения в медицинский холодильник обеспечивает надежную сохранность КТ. Динамика изменения основных показателей, таких как количество тромбоцитов, тромбокрит, метаболическая активность и морфологическую картину, сохраняет значения в пределах нормативных значений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С целью рационализации работы службы крови, повышения эффективности и безопасности трансфузии концентратов тромбоцитов, рекомендуется внедрить в практику следующие аспекты производственной трансфузиологии.

1. Хранение концентратов тромбоцитов, заготовленных методом афереза, при температуре $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, что позволит увеличить срок хранения более чем в два раза;
2. При использовании холодового хранения и транспортировки КТ не использовать дополнительное дорогостоящее оборудование.
3. При использовании методики комбинированного хранения транспортировка концентратов тромбоцитов допустима совместно с эритроцитсодержащими гемокомпонентами.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные в результате проведенной работы данные по оценке качества и безопасности концентратов тромбоцитов в условиях пролонгированного холодового хранения подчеркивают важность дальнейшего развития данного направления производственной трансфузиологии. Актуальными для дальнейшего изучения остаются:

1. Изучение клиническое применение концентратов тромбоцитов, при их пролонгированном холодовом хранении в сравнении с регламентированными условиями;
2. Оценка клинической эффективности и безопасности концентратов тромбоцитов в добавочном растворе на основе фумарата натрия;
3. Изучение возможности мониторинга внеклеточных ДНК для использования данного маркера в качестве лабораторного критерия оценки функционального состояния тромбоцитов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АТФ – аденозинтрифосфат

ДМАЦ – диметилацетамид

ДМСО – диметилсульфоксид

ЗФР – забуференный физиологический раствор

ИЛ – интерлейкин

КТ – концентрат тромбоцитов

КТa – концентрат тромбоцитов, полученный методом цитафереза

ТА-РТПХ – трансфузионно-ассоциированная реакция «трансплантат против хозяина»

ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток

DAMPs – damage-associated molecular patterns, молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением

EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines, Европейский директорат по качеству медицинских препаратов

GP1b α – glycoprotein 1b α , гликопротеин 1b α

GP1b/3a – glycoprotein GP1b/3a, мембранный гликопротеин 1b/3a

HLA – human leukocyte antigen, человеческий лейкоцитарный антиген

HPA – human platelet antigen, человеческий тромбоцитарный антиген

NETs – neutrophil extracellular traps, нейтрофильные внеклеточные ловушки

PAS – platelet additive solution, добавочный раствор тромбоцитов

TRALI – transfusion-related acute lung injury, острое трансфузионно-ассоциированное поражение легких

vWF – von Willebrand factor, фактор фон Виллебранда

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамовский, С.В. Оценка качества и безопасности концентрата тромбоцитов на пролонгированных сроках хранения в условиях пониженной температуры / С.В. Абрамовский, А.В. Чечеткин, А.Д. Касьянов [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2022. – Т. 67. № S2. – С. 91.
2. Афанасьев, Б.В. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: настоящее, проблемы, перспективы / Б.В. Афанасьев, Л.С. Зубаровская, И.С. Моисеев // Российский Журнал детской гематологии и онкологии. – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 28-42.
3. Баховадинов, Б.Б. Кровезаменители. Компоненты крови. Посттрансфузионные реакции и осложнения / Б.Б. Баховадинов, Б.А. Барышев // Душанбе: Издательство «Мир полиграфии». – 2017. – 288 с.
4. Бутина, Е.В. Технические и организационные аспекты профилактики НЛА-аллоиммунизации и рефрактерности к трансфузиям тромбоцитов у гематологических больных / Е.В. Бутина, Ф.С. Шерстнев, О.Д. Максимов [и др.] // Трансфузиология. – 2018. – № 4. – С. 59-65.
5. Варламова, С.В. Дополнительные критерии оценки состояния здоровья доноров аппаратного тромбоцитафереза / С.В. Варламова, Н.Н. Калинин, М.О. Егорова [и др.] // Гематология и трансфузиология – 2014. – Т. 59, № 1. – С. 19-25.
6. Ветошкин, К.А. Результаты криоконсервирования донорских тромбоцитных концентратов при низких и ультранизких температурах / К.А. Ветошкин, С.В. Утемов, Ф.С. Шерстнев [и др.] // Трансфузиология. – 2015. – Т. 16, № 2. – С. 22-28.
7. Высочин, И.В. Заготовка и клиническое применение криоконсервированных эритроцитов и тромбоцитов / И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева, М.С. Макаров [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. –

№ 30. – С. 70-75.

8. Глазанова, Т.В. Влияние гемокомпонентной терапии на иммунный статус пациентов с заболеваниями системы крови / Т.В. Глазанова, О.Е. Розанова, И.Е. Павлова // Medline.ru. – 2011. – Т. 12. – С. 1197-1206.

9. Голощاپов, О.В. Фатальная посттрансфузионная реакция трансплантат против хозяина у пациента после аортокоронарного шунтирования (клиническое наблюдение) / О.В. Голощاپов, М.А. Эстрина, Н.Е. Иванова [и др.] // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2016. – Т. 13, № 5. – С. 50-57.

10. Губанов, М.Н. Инактивация патогенов в клеточных компонентах крови / М.Н. Губанов, И.Г. Чемоданов, В.В. Гайворонская [и др.] // Трансфузиология. – 2017. – Т. 18, № 3. – С. 15-36.

11. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, А.О. Шахзадова. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 239 с.

12. Карпова, О.В. Сравнительная характеристика методов заготовки и клинического применения аферезных концентратов тромбоцитов с использованием добавочного раствора / О.В. Карпова, И.В. Образцов, П.Е. Трахтман [и др.] // Онкогематология. – 2015. – Т. 10, № 2. – С. 63-68.

13. Касьянов, А.Д. Изучение влияния пролонгированного гипотермического хранения на концентрат тромбоцитов / А.Д. Касьянов, Г.В. Гришина, И.С. Голованова [и др.] // Трансфузиология. – 2022. – Т. 23, № 3. – С. 205-218.

14. Киселёва, Е.А. Новые подходы к получению и хранению концентрата тромбоцитов в медицинских организациях: диссертация канд. мед. наук: 14.01.21 / Е.А. Киселёва. – СПб., 2021. – 221 с.

15. Кищенко В.В. Тромбоцитарные везикулы - потенциальный маркер качества концентрата тромбоцитов / Кищенко В.В., Сироткина О.В., Сидоркевич С.В. [и др.]// Профилактическая и клиническая медицина. – 2020. – Т. 4, № 77 – С. 93-101.
16. Костин, А.И. Управление качеством / А.И. Костин, О.А. Майорова, А.В. Ложкин [и др.] // Трансфузиология. – 2011. – Т. 12, № 2. – С. 12-34.
17. Костяев, А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (обзорная статья) / А.А. Костяев, А.К. Мартусевич, А.А. Андреев // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016. – № 6. – С. 54-74.
18. Красильщикова, И.В. Концентрат тромбоцитов: тенденции развития технологий получения и хранения / И.В. Красильщикова, А.В. Чечеткин, А.Д. Касьянов [и др.] // Трансфузиология. – 2021. – № 3. – С. 218-234.
19. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Гематологические анализаторы. Интерпретация анализа крови: Методические рекомендации. – М., 2007. – 115 с.
20. Минеева, Н.В. Иммуногематологическое обследование доноров крови и (или) её компонентов и реципиентов: методические указания / Н.В. Минеева, Е.В. Бутина // ООО «Издательско-полиграфический комплекс «Гангут», СПб., 2017 – 60 с.
21. Минеева, Н.В. Частота выявления антиэритроцитарных, антилейкоцитарных, антитромбоцитарных аллоантител у больных гематологическими заболеваниями / Н.В. Минеева, С.В. Гавровская, И.И. Кробинец [и др.] // Онкогематология. – 2013. – № 4. – С. 13-17.
22. Пантелеев, М.А. Тромбоциты и гемостаз / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // Онкогематология. – 2014. – Т. 9, № 2. – С.65-73.

23. Певцов, Д.Э. Совершенствование производственной деятельности отделения переливания крови ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава Российской Федерации / Д.Э. Певцов, Б.Б. Баховадинов, Б.А. Барышев [и др.] // Трансфузиология. – 2020. – Т. 21, № 3. – С. 227-238.

24. Постановление Правительства РФ от 22.06.2019 №797 «Об утверждении Правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов и о признании утратившими силу некоторых актов Правительства Российской Федерации» – [Электронный ресурс] – Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_328029

25. Потапнев, М.П. Инфекционная безопасность донорской крови: проблемы и решения / М.П. Потапнев, В.Ф. Еремин // Гематология и трансфузиология. – 2013. – Т. 58, № 3. – С. 49-56.

26. Рахмани, А.Ф. Тактика трансфузионной терапии концентратами тромбоцитов у больных с депрессиями кроветворения / А.Ф. Рахмани, Е.А. Михайлова, И.В. Дубинкин // Гематология и трансфузиология. – 2017. – Т. 62, № 4. – С. 218-222.

27. Ройтман Е.В. Изменения гемостатических свойств сгустка при хранении тромбоцитных концентратов, заготовленных разными методами / Ройтман Е.В., И.М. Колесникова, О.В. Карпова [и др.] // Гематология и трансфузиология. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 30–34.

28. Румянцев, А.Г. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей: руководство для врачей / А.Г. Румянцев, А.А. Масчан // М.: Медицинское информационное агентство. – 2003. – С. 912.

29. Стандарт Общероссийской общественной организации «Российская ассоциация трансфузиологов»: «Донорская кровь и её компоненты: характеристики и контроль качества. XV.

Криоконсервированные тромбоциты, полученные методом афереза» №15 от 01.04.2005. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.transfusion.ru/rat/rat.php>.

30. Уйба, В.В. Развитие безвозмездного донорства крови и ее компонентов в Российской Федерации / В.В. Уйба, О.В. Эйхлер, А.В. Чечёткин [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2017. – № 1. – С. 8-13.

31. Чеботкевич, В.Н. Проблемы бактериальной безопасности гемотрансфузий / В.Н. Чеботкевич, Е.И. Кайтанджан, Е.А. Киселева [и др.] // Трансфузиология. – 2015. – № 3. – С. 14-25.

32. Чемоданов, И.Г. Мультикомпонентное донорство / И.Г. Чемоданов, М.Н. Губанова, Р.Ф. Аюпова и [др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2017. – Т. 20, № 1. – С. 154-159.

33. Чечёткин, А.В. Анализ показателей деятельности службы крови Российской Федерации в 2019 году / А.В. Чечёткин, Данильченко, М.Ш. Григорьян [и др.] // Трансфузиология. – 2020. – Т. 21, № 3. – С. 200-210.

34. Чечёткин, А.В. Влияние инактивации патогенов на качество и показатели биологической полноценности компонентов донорской крови / А.В. Чечёткин, А.Д. Касьянов, В.Е. Солдатенков [и др.] // Medline.ru. – 2015. – Т. 16. – С. 779-790.

35. Чечёткин, А.В. Основные итоги деятельности службы крови Российской Федерации в 2015 году / А.В. Чечеткин, В.В. Данильченко, М.Ш. Григорьян [и др.] // Трансфузиология. – 2016. – № 3. – С. 4-13.

36. Чечёткин, А.В. Основные показатели деятельности службы крови Российской Федерации в 2018 году / А.В. Чечёткин, В.В. Данильченко, М.Ш. Григорьян [и др.] // Трансфузиология. – 2019. – Т. 20, № 3. – С. 160-170.

37. Чечёткин, А.В. Применение методов афереза для заготовки компонентов донорской крови в службе крови Российской Федерации / А.

В. Чечеткин, В.В. Данильченко, М.Ш. Григорьян [и др.] // Трансфузиология. – 2017. – № 1. – С. 4-14.

38. Шамова, Е.В. Регуляция функциональных и механических свойств тромбоцитов и эритроцитов донорами монооксида азота / Е.В. Шамова, О.Д. Бичан, Е.С. Дрозд [и др.] // Биофизика. – 2011. – Т. 56, вып. 2. – С. 265-271.

39. Шерстнев, Ф.С. Эффективность криоконсервирования при -80°C тромбоцитарных концентратов для клинического применения / Ф.С. Шерстнев, С.В. Утемов, А.А. Костяев [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2017. – Т. 3, № 61. – С. 59-64.

40. Шерстнев, Ф.С. Эффективность трансфузий криоконсервированных при -80°C донорских тромбоцитных концентратов у больных гемобластозами: диссертация канд. мед. наук: 14.01.21 / Ф.С. Шерстнев. – М., 2013. – 103 с.

41. Шитикова, А.С. Тромбоцитарный гемостаз: монография / А.С. Шитикова // Изд-во СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. – СПб., 2000. – С. 222.

42. Agey, A. Effects of Intercept pathogen reduction treatment on extended cold storage of apheresis platelets / A. Agey, K. Reddoch-Cardenas, C. McIntosh [et al.] // Transfusion. – 2021. – Vol. 61, № 1. – P. 167-177.

43. Andreu, G. Introduction en pratique transfusionnelle des concentrés de plaquettes en solution de conservation. Avantages, inconvénients, et intérêt pour les patients [Introduction of platelet additive solutions in transfusion practice. Advantages, disadvantages and benefit for patients] / G. Andreu, J. Vasse, F. Hervé [et al.] // Transfus Clin Biol. – 2007. – Vol. 14, № 1. – P. 100-106.

44. AuBuchon, J.P. Update on the status of pathogen inactivation methods / J.P. AuBuchon // ISBT Science Series. – 2011. – Vol. 6, № 1. – P. 181-188.

45. Baghdadi, V. Platelets apoptosis and clearance in the presence of sodium octanoate during storage of platelet concentrate at 4°C / V. Baghdadi, F.

Yari, M. Nikougoftar [et al.] // Cell J. – 2020. – Vol. 22, № 2. – P. 212-217.

46. Bagheri S., Samiee S., Zarif M.N. et al. The evaluation of reactive oxygen species generation and free mitochondrial DNA in platelet concentrates during 5 days of storage. // Blood Coagul Fibrinolysis. – 2023. – Vol. 34, № 2 – P. 105-110.

47. Bashir, S. Platelet storage in more than 90% additive solution containing glucose and bicarbonate has the potential to increase shelf life / S. Bashir, K. Kemsley, K. Min [et al.] // Transfusion. – 2018. – Vol. 58, № 12. – P.2959-2968.

48. Becker, G.A. Studies of platelet concentrates stored at 22 C nad 4 C // G.A. Becker, M. Tuccelli, T. Kunicki [et al.] // Transfusion. – 1973. – Vol. 13, № 2. – P. 61-68.

49. Bertolini, F. Role of acetate during platelet storage in a synthetic medium / F. Bertolini, S. Murphy, P. Rebullia [et al.] // Transfusion. – 1992. – Vol. 32, № 2. – P. 152-156.

50. Bode, A.P. Effect of cold storage on platelet glycoprotein Ib and vesiculation / A.P. Bode, C.L. Knupp // Transfusion. – 1994. – Vol. 34, № 8. – P. 690-696.

51. Bode, A.P. Vesiculation of platelets during in vitro aging / A.P. Bode, S.M. Orton, M.J. Frye [et al.] // Blood. – 1991. – Vol. 15, № 77 (4). – P. 887-895.

52. Bohec, P. Acoustophoretic purification of platelets: feasibility and impact on platelet activation and function / P. Bohec P, J. Gachelin, V. Ollivier [et al.] // Platelets. – 2019. – Vol. 30, №. 2. – P. 1741-1800.

53. Borzini, P. Platelet cryopreservation using second-messenger effector and low-dose (2%) dimethyl sulfoxide. In vitro evaluation of post-thawing platelet activity with the platelet function analyzer / P. Borzini, A. Lazzaro, L. Mazzucco [et al.] // Haematologica. – 2000. – Vol. 85, № 8. – P. 885-887.

54. Boudreau, L.H. Platelets release mitochondria serving as substrate for

bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation / L.H. Boudreau, A.C. Duchez, N. Cloutier [et al.] // *Blood*. – 2014. – Vol. 2, № 124 (14). – P. 2173-2183.

55. Braathen, H. In vitro quality and platelet function of cold and delayed cold storage of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution for 21 days / H. Braathen, J. Sivertsen, T. Helen [et al.] // *Transfusion*. – 2019. – Vol. 59, Suppl. 8. – P. 2652-2661.

56. Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 5, № 303 (5663) – P. 1532-1535.

57. Burnouf, T. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: Are they clinically beneficial or harmful? / T. Burnouf, M.L. Chou, H. Goubran [et al.] // *Transfus Apher Sci*. – 2015. – Vol. 53, №2. – P. 137-145.

58. Bynum, J.A. Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability / J.A. Bynum, M.A. Meledeo, T.M. Getz [et al.] // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, Suppl 1. – S. 76-84.

59. Cancelas, J.A. Future of platelet formulations with improved clotting profile: a short review on human safety and efficacy data / J.A. Cancelas // *Transfusion*. – 2019. – Vol. 59– P. 1467-1473.

60. Chegini, A. Comparison mitochondrial DNA DAMPs changes in platelet prepared by apheresis and PRP / A. Chegini, L. Vakili, S. Samiee [et al.] // *Ther Apher Dial*. – 2023. – Vol. 27, № 3. – P. 517-522.

61. Chen, W. Refrigeration-induced binding of von Willebrand factor facilitates fast clearance of refrigerated platelets / W. Chen, S.A. Druzak, Y. Wang [et al.] // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2017. – Vol. 37, № 12. – P. 2271-2279.

62. Chetan, M.S. TRALI and platelets: strategies to improve platelet availability at your Blood Center / M.S. Chetan // *Transfusion*. – 2007. – Vol. 47, № 3. – P. 232.
63. Cohn, C.S. Cryopreserved platelets: the thaw begins / C.S. Cohn, S.Williams // *Transfusion*. – 2019. – Vol. 59, Suppl. 9. – P. 2759-2762.
64. Currie, L.M. Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4 degrees C with retention of in vitro functional activity / L.M. Currie, J.R. Harper, H. Allan [et al.] // *Transfusion*. – 1997. – Vol. 37, № 1. – P. 18-24.
65. D' Atri, L.P. Platelet toll-like receptors in thromboinflammation / L.P. D' Atri, M. Schattner // *Front Biosci (Landmark Ed)*. – 2017. – Vol. 1, №22 (11). – P. 1867-1883.
66. Daskalakis, M. Evaluation of the performance of Trima Accel® v5.2 for the collection of concentrated high-dose platelet products and concurrent plasma from high platelet count donors, in Germany / M. Daskalakis, C. Schulz-Huotari, M. Burger [et al.] // *J Clin Apher*. – 2012. – Vol. 27, № 2. – P. 75-80.
67. de Wildt-Eggen, J. Storage of platelets in additive solutions: effects of magnesium and/or potassium / J. de Wildt-Eggen, J.G. Schrijver, M. Binns, H [et al.] // *Transfusion*. – 2002. – Vol. 42, № 1. – P. 76-80.
68. Devine, D.V. The platelet storage lesion / D.V. Devine, R. Serrano // *Clin. Lab. Med*. – 2010. – Vol. 30. – P. 475-487.
69. Diamant, M. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? / M. Diamant, M.E. Tushuizen, A. Sturk [et al.] // *Eur J Clin Invest*. – 2004. – Vol. 34, № 6. – P. 392-401.
70. Diedrich, B. In vitro and in vivo effects of potassium and magnesium on storage up to 7 days of apheresis platelet concentrates in platelet additive solution / B. Diedrich, P. Sandgren, B. Jansson [et al.] // *Vox Sang*. – 2008. – Vol. 94, № 2. – P. 96-102.

71. Doery, J.C. Energy metabolism in human platelets: interrelationship between glycolysis and oxidative metabolism / J.C. Doery, J. Hirsh, I. Cooper // *Blood*. – 1970. – Vol. 36, № 2. – P. 159-168.
72. Doescher, A. Non-invasive pH monitoring of platelet concentrates / A. Doescher, C. Vogt, E.K. Petershofen [et al.] // *Vox Sang.* – 2013. – Vol. 105, Suppl. 1. – P. 84.
73. Dohan Ehrenfest, D.M. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) / D.M. Dohan Ehrenfest, L. Rasmusson, T. Albrektsson // *Trends Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27, № 3. – P. 158-167.
74. Dumont, L.J. Interruption of agitation of platelet concentrates: a multicenter in vitro study by the BEST Collaborative on the effects of shipping platelets / L.J. Dumont, H. Gulliksson, P.F. van der Meer [et al.] // *Transfusion.* – 2007. – Vol. 47, № 9 – P. 1666-1673.
75. Eder, A.F. Bacterial screening of apheresis platelets and the residual risk of septic transfusion reactions: the American Red Cross experience (2004-2006) / A.F. Eder, J.M. Kennedy, B.A. Dy, [et al.] // *Transfusion.* – 2007. – Vol. 47, Suppl. 7. – P. 1134-1142.
76. Ekaney, M.L. Cytochrome c and resveratrol preserve platelet function during cold storage / M.L. Ekaney, M.A. Grable W.F. 4th Powers [et al.] // *J Trauma Acute Care Surg.* – 2017. – Vol. 83, № 2. – P. 271-277.
77. El Rayes, T. Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1 / T. El Rayes, R. Catena, S. Lee [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – Vol. 29, № 112 (52) – P. 160-165.
78. Ezuki, S. Survival and recovery of apheresis platelets stored in a polyolefin container with high oxygen permeability / S. Ezuki, T. Kanno, H. Ohto [et al.] // *Vox Sang.* – 2008. – Vol. 94, № 4. – P. 292-298.

79. Feng, Q. The effects of autoflow management on flow-rate alerts, collection efficiency, and collection rate during plateletpheresis / Q. Feng, J. Xu, C. Li [et al.] // *Transfus Apher Sci.* – 2020. – Vol. 59, № 6. – P. 1-5.

80. Ferrer, F. Effect of cold-storage in the accumulation of bioreactive substances in platelet concentrates treated with second messenger effects / F. Ferrer, J. Rivera, M.L. Lozano [et al.] // *Haematologica.* – 2001. – Vol. 86, № 5. – P. 530-536.

81. Fitzpatrick, M.G. Novel platelet products under development for the treatment of thrombocytopenia or acute hemorrhage / M.G. Fitzpatrick // *Transfus Apher Sci.* – 2019. – Vol. 58, № 1. – P. 7-11.

82. Fontana, S. Prospective, paired crossover comparison of multiple, single-needle plateletpheresis procedures with the Amicus and Trima Accel cell separators / S. Fontana, L. Mordasini, P. Keller [et al.] // *Transfusion.* – 2006. – Vol. 46, № 11. – P. 2004-2010.

83. Freedman, J.E. Nitric oxide release from activated platelets inhibits platelet recruitment / J.E. Freedman, J. Loscalzo, M.R. Barnard, [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 100, № 2. – P. 350–356.

84. Garraud, O. Platelets and immunity: From physiology to pathology / O. Garraud, A. Chabert, H. Hamzeh-Cognasse [et al.] // *Transfus Clin Biol.* – 2017. – Vol. 24, №2. – P. 83-86.

85. Gathof, B.S. Pathogen inactivation/reduction of platelet concentrates: turning theory into practice / B.S. Gathof, M.E. Tauszig, S.M. Picker // *Vox Sang.* – 2010. – № 5. – P. 114-119.

86. George, S.K. Comparative analysis of platelet-derived extracellular vesicles using flow cytometry and nanoparticle tracking analysis / S.K. George, L. Lauková, R. Weiss [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 7, № 22(8). – P. 3839.

87. Gerber, B. Safety and efficacy of cryopreserved autologous platelet concentrates in HLA-alloimmunized patients with hematologic malignancies / B.

Gerber, L. Alberio, S. Rochat [et al.] // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, № 10. – P. 2426-2437.

88. Getz, T.M. Physiology of cold-stored platelets / T.M. Getz // *Transfus Apher Sci.* – 2019. – Vol. 58, № 1. – P. 12-15.

89. Getz, T.M. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses / T.M. Getz, R.K. Montgomery, J.A. Bynum [et al.] // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, № 6. – P. 1320-1328.

90. Gil-Betacur, A. Effect of plateletpheresis on the white blood cell count: meta-analysis 1980-2018 / A. Gil-Betacur, C.Y. Mantilla-Gutierrez, J. A. Cardona-Arias // *Rev. Esp. Salud. Publica.* – 2019. – P. 93.

91. Gómez, R.M. Platelets and extracellular traps in infections / R.M. Gómez, A.O. López Ortiz, M. Schattner // *Platelets*. – 2021. – Vol. 3, № 32 (3) – P. 305-313.

92. Goubran, H.A. Platelet microparticle: a sensitive physiological "fine tuning" balancing factor in health and disease / H.A. Goubran, T. Burnouf, J. Stakiw [et al.] // *Transfus Apher Sci.* – 2015. – Vol. 52, № 1. – P. 12-18.

93. Gulliksson, H. Platelet storage media / H. Gulliksson // *Vox Sang.* – 2014. – Vol. 107, № 2. – P. 205-212.

94. Gulliksson, H. Storage of platelets in additive solutions: effects of phosphate / H. Gulliksson, S. Larsson, G. Kumlien [et al.] // *Vox Sang.* – 2000. – Vol. 78, № 3. – P. 176-184.

95. Gulliksson, H. Storage of platelets in additive solutions: the effect of citrate and acetate in in vitro studies / H. Gulliksson // *Transfusion*. – 1993. – Vol. 33, № 4. – P. 301-303.

96. Gulliksson, H. Defining of optimal storage conditions for the long-term storage of platelets // *Transfus. Med. Rev.* – 2003. – Vol. 17. – P. 209-215.

97. Guppy, M. Alternative fuels for platelet storage: a metabolic study / M.

Guppy, M.E. Whisson, R. Sabaratnam [et al.] // *Vox Sang.* – 1990. – Vol. 59, № 3. – P. 146-152.

98. Habets, K.L. Platelets and autoimmunity / K.L. Habets, T.W. Huizinga, R.E. Toes // *Eur J Clin Invest.* – 2013. – Vol. 43, № 7. – P. 746-757.

99. Handigund, M. N-acetylcysteine reduce the stress induced by cold storage of platelets: a potential way to extend shelf life of platelets / M. Handigund, J.T. Kim, T.W. Bae [et al.] // *Transfus Apher Sci.* – 2021. – Vol. 60, № 2. – P. 103-039.

100. Harrison, P. Clinical tests of platelet function / P. Harrison, D. Keeling // In book: *Platelets. Chapter 23. Clinical tests of platelet function* – Elsevier Science. – 2007. – P. 445-474.

101. Hegde, S. Towards increasing shelf life and haemostatic potency of stored platelet concentrates / S. Hegde, H. Akbar, Y. Zheng [et al.] // *Curr Opin Hematol.* – 2018. – Vol. 25, № 6. – P. 500-508.

102. Hethershaw, E.L. The effect of blood coagulation factor XIII on fibrin clot structure and fibrinolysis / E.L. Hethershaw, A.L. Cilia La Corte, C. Duval [et al.] // *J Thromb Haemost.* – 2014. – Vol. 12, № 2. – P. 197-205.

103. Hillyer, C.D. Component preparation and manufacturing. In: *Transfusion medicine and hemostasis: clinical and laboratory aspects* / C.D. Hillyer, B. Shaz, J. Zimring [et al.] // Elsevier, first edition. – 2009. – P. 45-51.

104. Hitzler, W.E. Apherese- und Pool-thrombozytenkonzentrat – Wertigkeit und Bewertung beider Blutkomponenten [Single-donor (apheresis) platelets and pooled whole-blood-derived platelets – significance and assessment of both blood products] / W.E. Hitzler // *Clin Lab.* – 2014. – Vol. 60, № 4. – P. 1-39.

105. Hoffmeister, K.M. The clearance mechanism of chilled blood platelets / K.M. Hoffmeister, T.W. Felbinger, H. Falet, [et al.] // *Cell.* – 2003. – Vol. 10, № 112 (1). – P. 87-97.

106. Hoffmeister, K.M. Mechanisms of cold-induced platelet actin assembly / K.M. Hoffmeister, H. Falet, A. Toker [et al.] // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276, № 27. – P. 24751–24759.

107. Holme, S. Storage and quality assessment of platelets / S. Holme // *Vox Sang.* – 1998. – Vol.74, Suppl 2. – P.207-216.

108. Homier, V. Drone versus ground delivery of simulated blood products to an urban trauma center: The Montreal Medi-Drone pilot study / V. Homier, D. Brouard, M. Nolan [et al.] // *J Trauma Acute Care Surg.* – 2021. – Vol. 1, № 90 (3). – P. 515-521.

109. Iwamoto, S. The release mechanism of platelet-activating factor during shear-stress induced platelet aggregation / S. Iwamoto, T. Kawasaki, J. Kambayashi [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – Vol. 9, № 239 (1). – P. 101-105.

110. Jagasia, M. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation / M. Jagasia, M. Arora, M.E.D. Flowers [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 119. – P. 296-307.

111. Jansen, A.J. Desialylation accelerates platelet clearance after refrigeration and initiates GPIIb/IIIa metalloproteinase-mediated cleavage in mice / A.J. Jansen, E.C. Josefsson, V. Rumjantseva [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol. 2, № 119 (5). – P. 1263-1273.

112. Jimenez-Marco, T. Frozen and cold-stored platelets: reconsidered platelet products / T. Jimenez-Marco, A. Castrillo, F. Hierro-Riu [et al.] // *Platelets.* – 2022. – Vol. 2, № 33 (1). – P. 27-34.

113. Johnson, L. Characterization of biologic response modifiers in the supernatant of conventional, refrigerated, and cryopreserved platelets / L. Johnson, S. Tan, E. Jenkins [et al.] // *Transfusion.* – 2018. – Vol. 58, № 4. – P. 927-937.

114. Johnson, L. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications / L. Johnson, M. Reade, R. Hyland et al. //

Transfusion. – 2015. – Vol. 55, № 4. – P. 838–847.

115. Johnson, L. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions / L. Johnson, S. Tan, B. Wood [et al.] // Transfusion. – 2016. – Vol. 56, № 7. – P. 1807-1818.

116. Johnson, L. Refrigeration of apheresis platelets in platelet additive solution (PAS-E) supports in vitro platelet quality to maximize the shelf-life / L. Johnson, S. Vekariya, B. Wood et al. // Transfusion. – 2021. – Vol. 61, Suppl. 1. – P. 58–67.

117. Johnson, L.N. Cryopreservation of buffy-coat-derived platelet concentrates in dimethyl sulfoxide and platelet additive solution / L.N. Johnson, K.M. Winter, S. Reid [et al.] // Cryobiology. – 2011. – Vol. 62, № 2. – P. 100-106.

118. Keitel, S. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components (20th edn) / S. Keitel // European Committee (partial agreement) of blood transfusion (CD-P-TS). – 2020. – P. 239.

119. Kelly, K. Frozen platelets – development and future directions / K. Kelly, J.A. Cancelas, Z.M. Szczepiorowski [et al.] // Transfus Med Rev. – 2020. – Vol. 34, № 4. – P. 286-293.

120. Ketter, P.M. Platelet enhancement of bacterial growth during room temperature storage: mitigation through refrigeration / P.M. Ketter, R. Kamucheka, B. Arulanandam [et al.] // Transfusion. – 2019. – Vol. 59, Suppl. 2. – P. 1479-1489.

121. Klinger, M.H. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects / M.H. Klinger // Ann Hematol. – 1996. – Vol. 73, № 3. – P. 103-112.

122. Koerner, K. Platelet function after shipment of room temperature platelet concentrates / K. Koerner // Vox Sang. – 1983. – Vol. 44, № 1. – P. 37-41.

123. Koessler, J. The impact of cold storage on adenosine diphosphate-

mediated platelet responsiveness / J. Koessler, P. Klingler, M. Niklaus [et al.] // TH Open. – 2020. – Vol. 13, № 4(3). – P. 163-172.

124. Krause, M. Noninvasive pH measurement to monitor changes during suboptimal storage of platelet concentrates / M. Krause, A. Doescher, B. Zimmermann [et al.] // Transfusion. – 2010. – Vol. 50, № 10. – P. 2185-2192.

125. Kunicki, T.J. A study of variables affecting the quality of platelets stored at «room temperature» / T.J. Kunicki, M. Tuccelli, G.A. Becker [et al.] // Transfusion. – 1975. – Vol. 15, № 5. – P. 414-421.

126. Lacroix, R. Revisited role of microparticles in arterial and venous thrombosis / R. Lacroix, C. Dubois, A.S. Leroyer [et al.] // J Thromb Haemost. – 2013. – Vol. 11, Suppl 1. – P. 24-35.

127. Lannan, K.L. Resveratrol preserves the function of human platelets stored for transfusion / K.L. Lannan, M.A. Refaai, S.K. Ture [et al.] // Br J Haematol. – 2016. – Vol. 172, № 5. – P. 794-806.

128. Lazarus, E.F. Sustained decreases in platelet count associated with multiple, regular plateletpheresis donations / E.F. Lazarus, J. Browning, J. Norman [et al.] // Transfusion. – 2001. – Vol. 41, Suppl. 6. – P. 756-761.

129. Leitner, G.C. Additive solutions differentially affect metabolism and functional parameters of platelet concentrates / G.C. Leitner, J. List, M. Horvath // Vox Sang. – 2016. – Vol. 110, № 1. – P. 20-26.

130. Levy, J.H. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention / J.H. Levy, M.D. Neal, J.H. Herman // Critical Care. – 2018. – Vol. 22, № 271. – P. 2-8.

131. Ling, G. Aerial drones for blood delivery / G. Ling, N. Draghic // Transfusion. – 2019. – Vol. 59. – P. 1608-1611.

132. Macher, S. Influence of multicomponent apheresis on donors' haematological and coagulation parameters, iron storage and platelet function / S. Macher, S. Sipurzynski-Budraß, K. Roskopf [et al.] // Vox Sang. – 2012. – Vol.

103, № 3. – P. 194-200.

133. Manasa, K. Influence of oxidative stress on stored platelets / K. Manasa, R. Vani // *Adv. Hematol.* – 2016. – Vol. 1. – P. 6.

134. Marini, I. Cold storage of platelets in additive solution: the impact of residual plasma in apheresis platelet concentrates / I. Marini, K. Aurich, R. Jouni [et al.] // *Haematologica.* – 2019. – Vol. 104, № 1. – P. 207-214.

135. Masterson, M.E. Pretransfusion blood irradiation. Clinical rationale and dosimetric considerations / M.E. Masterson, R. Febo // *Med Phys.* – 1992. – Vol. 19. – P. 649-657.

136. Masucci, M.T. The emerging role of neutrophil extracellular traps (NETs) in tumor progression and metastasis / M.T. Masucci, M. Minopoli, S. Del Vecchio [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 16, № 11 – P. 1749.

137. Mathur A., N. Swamy, S. Thapa et al. Adding to platelet safety and life: platelet additive solutions. // *Asian J Transfus Sci.* – 2018. – Vol. 12, № 2. – P. 136–140.

138. Matijevic, N. Multiple levels of degradation diminish hemostatic potential of thawed plasma / N. Matijevic, V. Kostousov, Y.W. Wang, C.E. Wade [et al.] // *J Trauma.* – 2011. – Vol. 70, № 1 – P. 71-79; discussion 79-80.

139. Matthes, G.A. Options and cost effectiveness of multicomponent blood collection / G.A. Matthes // *Transfus Apher Sci.* – 2002. – Vol. 27, № 2. – P. 115-121.

140. Meftahpour, V. Platelet lysate: a promising candidate in regenerative medicine / V. Meftahpour, S. Malekghasemi, A. Baghbanzadeh [et al.] // *Regen Med.* – 2021. – Vol. 16, № 1. – P. 71-85.

141. Meinke, S. Cryopreservation of buffy coat-derived platelet concentrates photochemically treated with amotosalen and UVA light / S. Meinke, A. Wikman, G. Gryfelt [et al.] // *Transfusion.* – 2018. – Vol. 58, № 11. – P. 657-668.

142. Metcalfe, P. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods / P. Metcalfe, L.W. Williamson, C.P.M. Reutelingsperger [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1997. – Vol. 98, № 1. – P. 86-95.

143. Milford, E.M. Comprehensive review of platelet storage methods for use in the treatment of active hemorrhage / E.M. Milford, M.C. Reade // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, № 2. – P. 140-148.

144. Mohanty, T. Neutrophil extracellular traps in the central nervous system hinder bacterial clearance during pneumococcal meningitis / T. Mohanty, J. Fisher, A. Bakochi [et al.] // *Nat Commun*. – 2019. – Vol. 10, № 10 (1) – P. 1667.

145. Montgomery, R.K. Enhanced shear-induced platelet aggregation due to low-temperature storage / R.K. Montgomery, K.M. Reddoch, S.J. Evani [et al.] // *Transfusion*. – 2013. – Vol. 53, № 7. – P. 1520-1530.

146. Moroff, G. Characterizing the variation in pH measurements with apheresis platelets / G. Moroff, S. Seetharaman, J. Kurtz [et al.] // *Transfusion*. – 2011. – Vol. 51, № 11. -P. 2377-2383.

147. Murphy, S. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability – deleterious effect of refrigerated storage / S. Murphy S, F.H. Gardner // *N. Engl. J. Med*. – 1969 – Vol. 280. – P. 1094-1098.

148. Murphy, S. Platelet storage for transfusion / S. Murphy // *Semin Hematol*. – 1985. – Vol. 22, №3. – P. 165-177.

149. Murphy, S. Platelet storage for transfusion in synthetic media: further optimization of ingredients and definition of their roles / S. Murphy, T. Shimizu, J. Miripol // *Blood*. – 1995. – Vol. 86, № 10. – P. 3951-3960.

150. Murphy, S. Storage of platelet concentrates at 22°C / S. Murphy, S.N. Sayar, F.H. Gardner // *Blood*. – 1970. – Vol. 35, № 4. – P. 549-557.

151. Murphy, S. The efficacy of synthetic media in the storage of human platelets for transfusion / S. Murphy // *Transfus Med Rev.* – 1999. – Vol. 13, № 3. – P. 153-163.

152. Murphy, W.G. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an alternative approach to product safety / W.G. Murphy, M. Foley, C. Doherty [et al.] // *Vox Sang.* – 2008. – Vol. 95, Suppl. 1. – P. 13-19.

153. Nair, P.M. Platelets stored at 4°C contribute to superior clot properties compared to current standard-of-care through fibrin-crosslinking / P.M. Nair, S.G. Pandya, S.F. Dallo [et al.] // *British Journal of Haematology.* – 2017. – Vol. 178, № 1. – P. 119-129.

154. Napolitano, M. Buffy coat-derived platelets cryopreserved using a new method: results from a pivotal clinical trial on thrombocytopenic patients with acute leukaemia / M. Napolitano, S. Mancuso, S. Raso [et al.] // *Transfus. Apher. Sci.* – 2019. – Vol. 58, Suppl. 6. – P. 1026-1066.

155. Ng, M.S.Y. Platelet storage lesions: what more do we know now? / M.S.Y. Ng, J.P. Tung, J.F. Fraser // *Transfus Med Rev.* – 2018. – Vol. 17. – P. 0887-7963.

156. Nie, Y. Platelet cryopreservation using a trehalose and phosphate formulation / Y. Nie, J.J. de Pablo, S.P. Palecek // *Biotechnol Bioeng.* – 2005. – Vol. 92, № 1. – P. 79-90.

157. Nogava, M. Parallel comparison of apheresis-collected platelet concentrates stored in four different additive solutions / M. Nogava, Y. Naito, M. Chatani // *Vox Sang.* – 2013. – Vol. 105, № 4. – P. 305-312.

158. Nolan, J.P. Detection of platelet vesicles by flow cytometry / J.P. Nolan, J.C. Jones // *Platelets.* – 2017. – Vol. 28, № 3. – P. 256-262.

159. Nurden, A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration / A.T. Nurden // *Thromb Haemost.* – 2011. – Vol. 105, Suppl. 1. – P. 13-33.

160. Oikawa, S. In vitro analysis of volume-reduced washed platelet concentrates stored in bicarbonated Ringer's solution containing less than 5% residual plasma / S. Oikawa, M. Minegishi, K. Endo [et al.] // *Vox Sang.* – 2016. – Vol. 111, № 1. – P. 16-21.

161. Ozgonenel, B. Blood Components for Pediatric Transfusions / B. Ozgonenel, T.A. Nash, M. Rajpurkar // *Pediatr Rev.* – 2020. – Vol. 41, № 5. – P. 259-261.

162. Pavenski, K. HLA alloimmunization against platelet transfusions: pathophysiology, significance, prevention and management / K. Pavenski, J. Freedman, J.W. Semple // *Tissue antigens.* – 2012. – Vol.79. – P.237-245.

163. Perrotta, P.L. Platelet transfusion medicine / P.L. Perrotta, J. Parsons, H.M. Rinder [et al.] // 2013. – P. 1275-1303.

164. Pidcoke, H.F. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards / H.F. Pidcoke, P.C. Spinella, A.K. Ramasubramanian [et al.] // *Shock.* – 2014. – Vol. 41, Suppl. 1. – P. 51-53.

165. Popovsky, M.A. Multicomponent apheresis blood collection in the United States: current status and future directions / M.A. Popovsky // *Transfus Apher Sci.* – 2005. – Vol. 32, № 3. – P. 299-304.

166. Porter, J.B. New insights into transfusion-related iron toxicity: implications for the oncologist // J.B. Porter, T. de Witte, M.D. Cappellini [et al.] // *Crit Rev Oncol Hematol.* – 2016. – Vol. 99. – P. 261-271.

167. Prochazkova, R. Markers of platelet activation and apoptosis in platelet concentrates collected by apheresis / R. Procházková, C. Andrýs, L. Hubáčková [et al.] // *Transfus. Apher. Sci.* – 2007. – Vol. 37, Suppl. 2. – P. 115-123.

168. Rebullà, P. A mini-review on platelet refractoriness / P. Rebullà // *Haematologica.* – 2005. – Vol. 90, Suppl. 2. – P. 247-253.

169. Reddoch, K.M. Hemostatic function of apheresis platelets stored at

4°C and 22°C / K.M. Reddoch, H.F. Pidcoke, R.K. Montgomery [et al.] // *Shock*. – 2014. – Vol. 41, Suppl. 1. – P. 54-61.

170. Reddoch-Cardenas, K.M. An in vitro pilot study of apheresis platelets collected on Trima Accel system and stored in TPAS+ solution at refrigeration temperature (1-6°C) / K.M. Reddoch-Cardenas, U. Sharma, C.L. Salgado [et al.] // *Transfusion*. – 2019. – Vol. 59, № 5. – P. 1789-1798.

171. Reddoch-Cardenas, K.M. Cold storage of platelets in platelet additive solution maintains mitochondrial integrity by limiting initiation of apoptosis-mediated pathways / K.M. Reddoch-Cardenas, G.C. Peltier, T.C. Chance [et al.] // *Transfusion*. – 2021. – Vol. 61, № 1. – P. 178-190.

172. Reddoch-Cardenas, K.M. Cold-stored platelets: a product with function optimized for hemorrhage control / K.M. Reddoch-Cardenas, J.A. Bynum, M.A. Meledeo, [et al.] // *Transfus. Apher. Sci.* – 2019. – Vol. 58, Suppl. 1. – P. 16-22.

173. Rodríguez-Nuevo, A. The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells / A. Rodríguez-Nuevo, A. Zorzano // *Cell Stress*. – 2019. – Vol. 23, № 3 (6). – P. 195-207.

174. Roh, J.S. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases / J.S. Roh, D.H. Sohn // *Immune Netw.* – 2018. – Vol. 13, № 18 (4). – P. 27.

175. Roweth, H.G. Lessons to learn from tumor-educated platelets / H.G. Roweth, E.M. Battinelli // *Blood*. – 2021. – Vol. 10, № 137 (23). – P. 3174-3180.

176. Rowley, S.D. Red blood cell-incompatible allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation / S.D. Rowley, M.L. Donato, P. Bhattacharyya // *Bone Marrow Transplantation*. – 2011. – Vol. 46. – P. 1167-1185.

177. Ruane, P.H. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light / P.H. Ruane, R. Edrich, D. Gampp [et al.] // *Transfusion*. – 2004. – Vol. 44, № 6. – P. 877-885.

178. Rumjantseva, V. Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance

of chilled platelets / V. Rumjantseva, P.K. Grewal, H.H. Wandall [et al.] // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15, № 11. – P. 1273-1280.

179. Saglam, S. Blood irradiation / S. Saglam, A. Cakir, S. Kuter // In: *Modern approaches to quality control.* Edited by A.B. Eldin /// *InTech.* – 2011. – Chapter 18. – P. 335-348.

180. Sandgren, P. Storage of buffy-coat-derived platelets in additive solutions: in vitro effects on platelets stored in reformulated PAS supplied by a 20% plasma carry-over / P. Sandgren, V. Mayaudon, J.M. Payrat [et al.] // *Vox Sang.* – 2010. – Vol. 98, № 3. – P. 415-422.

181. Schmidt, M. Improving blood donor screening by nucleic acid technology (NAT) / M. Schmidt, E. Seifried // *ISBT Science Series.* – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 219-229.

182. Schrezenmeier, H. Transfusion support / H. Schrezenmeier, S. Körper, B. Höchsmann [et al.] // In E. Carreras, C. Dufour, M. Mohty, N. Kröger, editors /// *The EBMT handbook. Hematopoietic stem cell transplantation.* – 2019. – P. 163-170.

183. Seftel, M.D. Universal prestorage leukoreduction in Canada decreases platelet alloimmunization and refractoriness / M.D. Seftel, H.G. Growe, T. Petraszko [et al.] // *Blood.* – 2004. – Vol. 103, № 1. – P. 333-339.

184. Seghatchian J. Platelet storage lesion and apoptosis: are they related? / J. Seghatchian, P. Krailadsiri // *Transfus Apher Sci.* – 2001. – Vol. 24, Suppl. 1. – P. 103-105.

185. Shea, S.M. The effect of platelet storage temperature on haemostatic, immune, and endothelial function: potential for personalised medicine / S.M. Shea, K.A. Thomas, P.C. Spinella // *Blood Transfus.* – 2019. – Vol. 17, № 4. – P. 321-330.

186. Sheu, J.R. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of magnesium in human platelets / J.R. Sheu, G. Hsiao, M.Y. Shen [et al.] // *Br J*

Haematol. – 2002. Vol. 119, № 4. – P. 1033-1041.

187. Shimizu, T. Roles of acetate and phosphate in the successful storage of platelet concentrates prepared with an acetate-containing additive solution / T. Shimizu, S. Murphy // *Transfusion*. – 1993. – Vol. 33, № 4. – P. 304-310.

188. Shrivastava, M. The platelet storage lesion / M. Shrivastava // *Transfus Apher Sci*. – 2009. – Vol. 41, № 2. – P. 105-113.

189. Sinauridze, E.I. Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets / E.I. Sinauridze, D.A. Kireev, N.Y. Popenko [et al.] // *Thromb Haemost*. – 2007. – Vol. 97, № 3. – P. 425-434.

190. Six, K.R. The ice recrystallization inhibitor polyvinyl alcohol does not improve platelet cryopreservation / K.R. Six, S. Lyssens, R. Devloo [et al.] // *Transfusion*. – 2019. – Vol. 59, № 9. – P. 3029-3031.

191. Six, K.R. Platelet biochemistry and morphology after cryopreservation / K.R. Six, V. Compernelle, H.B. Feys // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 31, № 21 (3). – P. 935.

192. Skripchenko, A. Automated cold temperature cycling improves in vitro platelet properties and in vivo recovery in a mouse model compared to continuous cold storage / A. Skripchenko, M.P. Gelderman, H. Awatefe [et al.] // *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, № 1. – P. 24-32.

193. Slichter, S.J. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets / S.J. Slichter, M. Jones, J. Ransom [et al.] // *Transfus Med Rev*. – 2014. – Vol. 28, № 4. – P. 212-225.

194. Standards for Blood Banks and Transfusion Services, 30th edition. – [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://goo.su/dcDEhn>

195. Stanworth, S. Platelet refractoriness – practical approaches and ongoing dilemmas in patient management / S. Stanworth, C. Navarrete, L. Estcourt [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2015. – Vol. 171. – P. 297-

305.

196. Stark, K. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology / K. Stark, S. Massberg // *Nat Rev Cardiol.* – 2021. – Vol. 18, № 9. – P. 666-682.

197. Steinbicker, A.U. Pediatric non-red cell blood product transfusion practices: what's the evidence to guide transfusion of the 'yellow' blood products? / A.U. Steinbicker, E. Wittenmeier, S.M. Goobie // *Curr Opin Anaesthesiol.* – 2020. – Vol. 33, № 2. – P. 259-267.

198. Stolla, M. Effects of storage time prolongation on in vivo and in vitro characteristics of 4°C-stored platelets / M. Stolla, S.L. Bailey, L. Fang [et al.] // *Transfusion.* – 2020. – Vol. 60, № 3. – P. 613-621.

199. Stubbs, J.R. The current state of the platelet supply in the US and proposed options to decrease the risk of critical shortages / J.R. Stubbs, M.J. Homer, T. Silverman [et al.] // *Transfusion.* – 2021. – Vol. 61, № 1. – P. 303-312.

200. Surowiecka, M. Anti-A and anti-B titers in group O platelet units are reduced in PAS C versus conventional plasma units / M. Surowiecka, N. Zantek, S. Morgan [et al.] // *Transfusion.* – 2014. – Vol. 54, № 1. – P. 255-256.

201. Sut, C. Assessment of soluble platelet CD40L and CD62P during the preparation process and the storage of apheresis platelet concentrates: Absence of factors related to donors and donations / C. Sut, C. Aloui, S. Tariket [et al.] // *Transfus. Clin. Biol.* – 2018. – Vol. 25, № 3. – P. 192-196.

202. Tanaka, K.A. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation / K.A. Tanaka, N.S. Key, J.H. Levy // *Anesth Analg.* – 2009. – Vol. 108, № 5. – P. 1433-1446.

203. Thomas, S. Platelets: handle with care / S. Thomas // *Transfus Med.* – 2016. – Vol. 26, № 5. – P. 330-338.

204. Thurairajah, K. The source of cell-free mitochondrial DNA in trauma and potential therapeutic strategies / K. Thurairajah, G.D. Briggs, Z.J. Balogh //

Eur J Trauma Emerg Surg. – 2018. – Vol. 44, № 3. – P. 325-334.

205. Tolksdorf, F. Theraflex UV-Platelets: performance of a new method for pathogen inactivation of plasma-reduced platelet concentrates / F. Tolksdorf, H. Mohr, W.H. Walker [et al.] // *Vox Sang.* – 2008. – Vol. 95, Supl. 1. – P. 309.

206. Tynngard, N. Haemostatic responsiveness and release of biological response modifiers following cryopreservation of platelets treated with amotosalen and ultraviolet A light / N. Tynngard, A. Wikman, M. Uhlin [et al.] // *Blood Transfus.* – 2019. – Vol. 4. – P. 1-8.

207. Tynngard, N. In vitro properties of platelets stored in three different additive solutions / N. Tynngard, M. Trinks, G. Berlin // *Transfusion.* – 2012. – Vol. 52, Supl. 5. – P. 1003-1009.

208. Vainer, H. Studies on human platelets stored at 20-22 degrees C without agitation / H. Vainer, R.J. Prost-Dvojaković, F. Jaisson [et al.] // *Acta Haematol.* – 1976. – Vol. 56, № 3. – P. 160-173.

209. Valeri, C.R. The current state of platelet and granulocyte cryopreservation / C.R. Valeri // *Crit Rev Clin Lab Sci.* – 1981. – Vol. 14, № 1. – P. 21-74.

210. Vamvakas, E.C. Relative safety of pooled whole blood-derived versus single-donor (apheresis) platelets in the United States: a systematic review of disparate risks / E.C. Vamvakas // *Transfusion.* – 2009. – Vol. 49, № 12. – P. 2743-2758.

211. van der Meer, P.F. PAS or plasma for storage of platelets? A concise review / P.F. van der Meer // *Transfus Med.* – 2016. – Vol. 26, №5. – P. 339-342.

212. Van der Meer P.F., de Korte D. Platelet Additive Solutions: A Review of the Latest Developments and Their Clinical Implications // *Transfus Med Hemother.* – 2018. – Vol. 45, № 2. – P. 98–102.

213. van der Meer, P.F. Platelet preservation: agitation and containers / P.F. van der Meer, D. de Korte // *Transfus Apher Sci.* – 2011. – Vol. 44, № 3. – P.

297-304.

214. van der Wal, D.E. Role of glycoprotein Ibalpha mobility in platelet function / D.E. van der Wal, S. Verhoef, R.E. Schutgens [et al.] // *Thromb Haemost.* – 2010. – Vol. 103, № 5. – P. 1033-1043.

215. Vassallo, R.R. Maintenance of in vitro properties of leukoreduced whole blood-derived pooled platelets after a 24-hour interruption of agitation / R.R. Vassallo, S.J. Wagner, M. Einarson [et al.] // *Transfusion.* – 2009. – Vol. 49, № 10. – P. 2131-2135.

216. Wagner, S.J. Comparison of the in vitro properties of apheresis platelets during 7-day storage after interrupting agitation for one or three periods / S.J. Wagner, R. Vassallo, A. Skripchenko [et al.] // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48, № 12. – P. 2492-2500.

217. Wagner, S.J. The maintenance of platelet properties during 20-24 degrees C storage after periods of shipment or interrupted agitation / S.J. Wagner // *Transfus Apher Sci.* – 2010. – Vol. 42, № 1. – P. 45-51.

218. Warner, M.A. Transition from room temperature to cold-stored platelets for the preservation of blood inventories during the COVID-19 pandemic / M.A. Warner, E.B. Kurian, S.A. Hammel [et al.] // *Transfusion.* – 2021. – Vol. 61, № 1. – P. 72-77.

219. Waters, L. Characterizing the ability of an ice recrystallization inhibitor to improve platelet cryopreservation / L. Waters, R. Ben, J.P. Acker [et al.] // *Cryobiology.* – 2020. – Vol. 96. – P. 152-158.

220. Waters, L. Refrigeration, cryopreservation and pathogen inactivation: an updated perspective on platelet storage conditions / L. Waters, M. Cameron, M.P. Padula [et al.] // *Vox Sanguinis.* – 2018. – P. 1-12.

221. Wiedmer, T. Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor / T. Wiedmer, S.J. Shattil, M. Cunningham [et al.] //

Biochemistry. – 1990. – Vol. 23, № 29 (3). – P. 623-632.

222. Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma / P. Wolf // *Br J Haematol.* – 1967. – Vol. 13, № 3. – P. 269-288.

223. Wood, B. Refrigerated storage of platelets initiates changes in platelet surface marker expression and localization of intracellular proteins / B. Wood, M.P. Padula, D.C. Marks [et al.] // *Transfusion.* – 2016. – Vol. 56, Suppl. 10. – P. 2548-2559.

224. Yan, Y. The role of microRNAs in platelet biology during storage / Y. Yan, J. Zhang, Q. Zhang [et al.] // *Transfus Apher Sci.* – 2017. – Vol. 56, № 2. – P. 147-150.

225. Yang, J. Evaluation of the advantages of platelet concentrates stored at 4°C versus 22°C / J. Yang, W. Yin, Y. Zhang [et al.] // *Transfusion.* – 2018. – Vol. 58, № 3. – P. 736-747.

226. Yang, J.C. Good hemostatic effect of platelets stored at 4°C in an in vitro model of massive blood loss and thrombocytopenia / J.C. Yang, F.H. Liu, Y. Sun [et al.] // *Medicine (Baltimore).* – 2019. – Vol. 98, № 18. – P. 154.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ

№ 205364

Мобильный термоконтейнер для транспортировки биологических материалов

Патентообладатель: *Абрамовский Станислав Владимирович (RU)*

Авторы: *Абрамовский Станислав Владимирович (RU), Добрецов Константин Григорьевич (RU), Лобанов Сергей Александрович (RU), Иванова Галина Геннадьевна (RU)*

Заявка № 2021105391

Приоритет полезной модели 02 марта 2021 г.

Дата государственной регистрации в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 12 июля 2021 г.

Срок действия исключительного права на полезную модель истекает 02 марта 2031 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Г. П. Ибрамов

