

ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный
специалист трансфузиолог
Департамента здравоохранения
города Москвы, д.м.н.

А.Ю. Буланов

«09 АПРЕЛЯ 2025 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 6



«19 МАЯ 2025 г.

ЗАГОТОВКА, ОЦЕНКА КАЧЕСТВА И ХРАНЕНИЕ
ПУЛИРОВАННЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ

Методические рекомендации № 20

Москва 2025

УДК: 612.116.3, 591.111.1

ББК: 53.537

З--14

Организация-разработчик:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы
«Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В.

Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Авторы:

Боровкова Наталья Валерьевна, д. м. н., заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ», доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России;

Буланов Андрей Юльевич, д. м. н., ведущий научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»;

Макаров Максим Сергеевич, д. б. н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»;

Сторожева Майя Викторовна, научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»;

Пономарев Иван Николаевич, к. м. н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»;

Костин Александр Игоревич, к. м. н., заведующий отделением клинической, производственной трансфузиологии и гравитационной хирургии крови ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»;

Виноградов Илья Антонович, врач-трансфузиолог ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ»

Рецензенты:

Ройтман Евгений Витальевич, д. б. н., проф., ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр неврологии»;

Проценко Денис Николаевич, д. м. н., доцент, директор ГБУЗ «ММКЦ “Коммунарка” ДЗМ», главный внештатный специалист по анестезиологии-реаниматологии ДЗМ

Заготовка, оценка качества и хранение пулированных концентратов тромбоцитов: методические рекомендации / сост. Н. В. Боровкова, А. Ю. Буланов, М. С. Макаров, [и др.]. – М. : ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ», 2025. – 26 с.

Методические рекомендации содержат теоретический и иллюстративный материал по производству, оценке качества и хранению тромбоцитных концентратов с использованием тромбоцитов, выделенных из доз цельной крови доноров.

Предназначены для освоения теоретических знаний и профессиональных практических навыков, необходимых для врачей-трансфузиологов, гематологов, сотрудников станций переливания крови и отделений производственной трансфузиологии.

Разработаны в ходе выполнения научно-исследовательской работы «Совершенствование логистических процессов обеспечения многопрофильных стационаров донорскими тромбоцитами».

Данный документ является собственностью Департамента здравоохранения города Москвы и не подлежит тиражированию и распространению без соответствующего разрешения

ISBN:

© Департамент здравоохранения города Москвы, 2025
© ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ», 2025
© Коллектив авторов, 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Получение и отбор тромбоцитарных фракций для пулирования.....	6
Пулирование тромбоцитов.....	9
Инактивация патогенов в пулированных концентратах тромбоцитов....	10
Оценка гемостатического потенциала пулированных концентратов тромбоцитов с помощью тромбоэластографии.....	11
Криоконсервирование и разморозка пулированных концентратов тромбоцитов.....	16
Заключение.....	24
Список литературы.....	25

ВВЕДЕНИЕ

Концентраты тромбоцитов (КТ) широко востребованы в клинической практике для предотвращения и купирования кровотечений [1–3, 12–15]. В течение 20 лет в Российской Федерации и в других странах наблюдается устойчивый рост потребности в КТ, что делает актуальным расширение донорского контингента, создания банков карантинизированных КТ, внедрение эффективных способов хранения тромбоцитов [4, 10, 13]. Основным способом заготовки КТ является аппаратный аферез. Так, в отделении трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ» ежегодно заготавливается 12 000 доз крови и 1700 доз аферезных КТ. Заготовка тромбоцитов, выделенных из доз цельной крови с последующим пулированием, в настоящее время имеет незначительные масштабы. Как правило, для достижения необходимого количества тромбоцитов в одной дозе пулированных КТ необходимо использовать тромбоцитарные фракции, выделенные из 4–6 доз цельной крови [8, 9, 16]. С учетом того что тромбоцитарные фракции в большинстве случаев утилизируются, заготовка КТ путем пулирования представляется оправданной в экономическом и стратегическом плане. Так, число полноценных доз КТ, полученных путем пулирования, в ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ» может достигать 3000 доз в год, что является значимым количеством. Пулирование тромбоцитов, выделенных из цельной крови, является альтернативным способом получения КТ для клинического применения. В связи с этим разработка методики изготовления и сохранения пулированных КТ (ПулКТ) является весьма актуальной. Оценка качества заготавливаемых КТ, согласно Постановлению 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 РФ» [11], производится на основании показателей безопасности, включающих объем дозы, содержание тромбоцитов, остаточное содержание лейкоцитов, значение рН и стерильность (кроме патоген-редуцированных КТ). Эти параметры не отражают структурную

и функциональную полноценность тромбоцитов в КТ. В связи с этим активно ведется поиск методов оценки качества ПулКТ. Как правило, для определения структурно-функциональной полноценности тромбоцитов ПулКТ используют методы агрегометрии [11–14], но такой подход не позволяет подробно оценить структуру популяции тромбоцитов в КТ. Для оценки структуры и функции тромбоцитов в концентрате может быть использован предложенный нами ранее метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов [5], а также модифицированная методика тромбоэластографии. При производстве ПулКТ необходимо обеспечить их биологическую безопасность, стерильность и клиническую эффективность. Поэтому мониторинг качества ПулКТ необходимо вести на разных этапах производства, включая анализ тромбоцитарных фракций еще до этапа пулирования, с целью оптимизации методик заготовки ПулКТ. Также важной задачей является длительное хранение ПулКТ, разработка и внедрение эффективных методик криоконсервирования и разморозки ПулКТ.

Освоение данных методических рекомендаций позволит усовершенствовать методики производства, оценки качества и хранения пулированных концентратов тромбоцитов, позволит расширить навыки работы с тромбоцитами в научно-практической и исследовательской сфере.

ПОЛУЧЕНИЕ И ОТБОР ТРОМБОЦИТАРНЫХ ФРАКЦИЙ ДЛЯ ПУЛИРОВАНИЯ

Исходные тромбоцитарные фракции получают в результате фракционирования крови путем жесткого центрифугирования с ускорением 2500–9000 g в течение 5–40 мин. [12, 14–18]. При таком центрифугировании происходит разделение цельной крови на 3 фракции: бесклеточная плазма, эритроцитарная масса и лейкоцитарный слой/концентрат (buffy coat), который в ряде методик обозначают как «промежуточная тромбоцитарная фракция» (intermediate platelet unit). В зависимости от методики центрифугирования в готовой тромбоцитарной фракции концентрация

тромбоцитов варьирует от 1000 до 5000 тыс. в 1 мкл, концентрация лейкоцитов – от 3 до 30 тыс. в 1 мкл. Необходимо учитывать: по мере увеличения ускорения возрастает степень повреждения тромбоцитов. Ранее нами было показано, что сразу после центрифугирования образцов свежезаготовленной крови с ускорением 1500–2000 g уровень тромбоцитов с гранулами (биологически полноценные тромбоциты) снижается в среднем на 5–6 %, при 2001–3000 g – на 7–10 %, при 3001–4000 g – на 15–20 %. Эти потери не учитывают дальнейшее снижение качества тромбоцитных фракций в процессе их хранения до получения отрицательных результатов на наличие гемотрансмиссивных инфекций. Как правило, между фракционированием исходной крови и получением сведений о биологической безопасности тромбоцитарных фракций проходит не менее полутора суток. Таким образом, пулирование тромбоцитов может быть выполнено только через 1,5–2 сут. с момента их выделения. За это время происходит дополнительное снижение качества тромбоцитов, поэтому при выделении тромбоцитов из доз цельной крови ускорение должно быть по возможности минимизировано. Непосредственно перед пулированием морфофункциональный статус тромбоцитов, выделенных из цельной крови, изначально снижен по сравнению с нормой (табл. 1). При этом выделенные тромбоцитарные фракции (ТФ) заметно варьируют по качеству тромбоцитов в их составе. Среди тромбоцитарных фракций можно выявить дозы с очень низким содержанием тромбоцитов с гранулами (менее 10 %) и дозы, где содержание тромбоцитов близко к норме (29–30 %). Тромбоциты, выделенные путем жесткого центрифугирования, часто обладают повышенной реактивностью и склонностью к спонтанной активации. Такие тромбоциты могут повышать общую функциональную активность всего тромбоцитарного пула при трансфузиях ПулКТ. С другой стороны, наличие в ПулКТ тромбоцитов, склонных к спонтанной активации, может создавать нежелательные клинические эффекты. В связи с этим актуальным является анализ

морфофункционального статуса тромбоцитов, включающий оценку их структурной целостности и функциональной активности.

Таблица 1. Морфофункциональные характеристики тромбоцитов, выделенных из консервированной крови доноров с помощью жесткого центрифугирования, через 2 сут. после выделения

Объект исследования	Общая концентрация тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$ Медиана [25 %; 75 %]	Доля тромбоцитов с гранулами, % Медиана [25 %; 75 %]	Морфофункциональный статус тромбоцитов, баллы Медиана [25 %; 75 %]
Кровь доноров	250 [186; 325]	54 [46; 62]	107 [88; 116]
ТФ, выделенные при ускорении 2500–2700 g	1877 [1679; 2025] *	23 [18; 25] *	52 [46; 58] *
ТФ, выделенные при ускорении 3000–4000 g	2416 [2115; 2760] **	12 [9; 12] **	43 [40; 47] **
*p < 0,05 относительно крови доноров; # p < 0,05 относительно центрифугирования при 2500–2700 g.			

В рамках научно-исследовательской работы в ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ» активно применяется метод микроскопической оценки тромбоцитов с использованием витальных флуорохромных красителей [5, 6]. Предложенный метод позволяет подробно оценить качество тромбоцитов в составе их тромбоцитарных фракций, однако для рутинного использования в практике производственной трансфузиологии этот метод является малодоступным. По нашим наблюдениям, существует корреляция между морфофункциональными параметрами тромбоцитов ТФ и их способностью образовывать тромбоцитарный гель *in vitro* при 20–22 °С. Для стимуляции образования тромбоцитарного геля смешивают 100 мкл ТФ и 5 мкл 10 %-ного хлорида кальция. При уровне тромбоцитов с гранулами более 20 % и нормальной скорости адгезии тромбоцитов тромбоцитарный гель из ТФ образуется в течение 20–30 мин. При уровне тромбоцитов с гранулами менее 20 %, при очень высоком уровне дефектных тромбоцитов, при низкой скорости

адгезии тромбоцитов тромбоцитарный гель не образуется или для образования тромбоцитарного геля требуется более 30 мин. Такой подход может быть использован в качестве экспресс-теста при отборе ТФ для пулирования.

ПУЛИРОВАНИЕ ТРОМБОЦИТОВ

В ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ» ПулКТ изготавливают на основе ТФ, выделенных из единичных доз цельной крови доноров на аппарате Reveos (Therumo ВСТ, США) при ускорении 2500–2700 g. Для выделения ТФ из крови доноров также могут быть использованы другие типы центрифуг. Для получения одной дозы ПулКТ используют 4 образца ТФ, выделенных из 4 доз крови кадровых доноров, имеющих одинаковые группу крови и резус-принадлежность. В процессе пулирования тромбоцитов к многоканальной закрытой стерильной системе, включающей лейкоцитарный фильтр и сухой гемоконтейнер, подключают 4 гемоконтейнера, содержащих по 25–30 мл ТФ. При смешивании конструкция системы обеспечивает не только объединение биоматериала, но также освобождение его от лейкоцитов и сохранение стерильности. После пулирования в суспензию тромбоцитов объемом 110–120 мл вносят 180–190 мл плазмозамещающего раствора SSP, таким образом, соотношение аутологичной плазмы и SSP в готовых ПулКТ составляет 2:3 (40/60 %). Установленный объем добавочного раствора SSP добавляют сразу по окончании процедуры пулирования из расчета не менее 40 мл раствора на 60×10^9 тромбоцитов. Использование плазмозамещающих растворов является стандартной процедурой при заготовке концентратов тромбоцитов с целью обеспечения сохранности клеток в ходе короткого или длительного хранения [1, 4]. Стандартный плазмозамещающий раствор SSP содержит буферную смесь на основе фосфатов, хелаторы кальция (цитрат, ацетат), соли магния и калия. Показано, что среда, содержащая 30–40 % аутологичной плазмы и 60–70 % плазмозамещающего раствора, сохраняет приемлемые значения рН и уровень глюкозы в концентрате тромбоцитов в течение 5 сут. хранения при комнатной температуре [4, 15].

В готовых ПулКТ концентрация тромбоцитов составляет в среднем $870 [800; 1030] \times 10^9/\text{л}$, общее содержание тромбоцитов – $269 [233; 294] \times 10^9$ в дозе, рН среды – $6,8 [6,7; 6,9]$, концентрация лейкоцитов не превышает 1×10^6 в дозе, что соответствует требованиям правил по заготовке крови [7]. Проведенный морфофункциональный анализ тромбоцитов ПулКТ показал: уровень тромбоцитов с гранулами и другие морфофункциональные параметры тромбоцитов значимо не меняются в процессе пулирования и лейкоредукции тромбоцитарных фракций и в процессе разведения аутологичной плазмы раствором SSP. Как и в исходных ТФ до пулирования, в ПулКТ часто наблюдается повышенная реактивность тромбоцитов.

ИНАКТИВАЦИЯ ПАТОГЕНОВ В ПУЛИРОВАННЫХ КОНЦЕНТРАТАХ ТРОМБОЦИТОВ

Инактивацию патогенов в пулированных и аферезных КТ в ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ» проводят на аппарате Intercept Illuminator (Cerus Corporation, США). В контейнер с тромбоцитами с соблюдением правил асептики и антисептики вносят вещество-инактиватор Амотосален до концентрации 150 мкМ , затем контейнер помещают в указанный аппарат под источник ультрафиолета малой энергии ($3,2\text{--}7 \text{ Дж/см}^2$) на 7 мин. По нашим данным, патоген-инактивация вызывает временное смещение рН ПулКТ в сторону более основных значений (до $7,0\text{--}7,1$), однако затем рН возвращается к значениям до патоген-инактивации. Уровень тромбоцитов с гранулами и другие морфофункциональные параметры тромбоцитов значимо не меняются в ПулКТ после патоген-инактивации. Общее содержание тромбоцитов с гранулами в 1 готовой дозе ПулКТ составляет в среднем 60×10^9 . По нашим данным, такое количество тромбоцитов с гранулами в лечебной дозе КТ является адекватным для купирования кровотечения [3, 10]. С другой стороны, в процессе короткого хранения при $20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ происходит постепенное снижение качества тромбоцитов ПулКТ на фоне сохранения их общего содержания в дозе. Через одни сутки хранения при $20\text{--}22 \text{ }^\circ\text{C}$ готового ПулКТ уровень тромбоцитов с гранулами снижается на $11\text{--}18 \%$, через двое суток –

на 25–35 %. В связи с этим рекомендуется по возможности оперативно использовать ПулКТ в клинической практике или обеспечивать длительное хранение ПулКТ путем криоконсервирования.

ОЦЕНКА ГЕМОСТАТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ПУЛИРОВАННЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ С ПОМОЩЬЮ ТРОМБОЭЛАСТОГРАФИИ

Существующие правила заготовки крови и ее компонентов не содержат регламентированных параметров, отражающих функциональную полноценность тромбоцитов и их гемостатический потенциал в составе КТ [7]. В научно-исследовательской практике для определения функциональной активности тромбоцитов КТ используют методы агрегометрии [1, 12, 19], однако такой подход требует использования специальных индукторов активации, не позволяет оценить взаимный эффект активации тромбоцитов и плазменных компонентов гемостаза. Для интегральной оценки коагулологических параметров оптимальным считается метод тромбоэластографии (ТЭГ). Описанные в литературе методики ТЭГ-исследования КТ проводят анализ тромбоцитов непосредственно в среде КТ, без учета влияния эритроцитов на вязкость и другие физические параметры крови, не содержат точной формулы расчета изменения параметров ТЭГ для оценки функционального потенциала тромбоцитов, содержат противоречивые данные по трактовке функционального потенциала тромбоцитов с помощью параметров ТЭГ. Все основные параметры, определяемые в ходе ТЭГ и определяющие активность гемостаза, рассчитаны на работу с кровью [2]. Таким образом, для ТЭГ-оценки функционального потенциала КТ, предназначенных для трансфузии, необходимо тестировать тромбоциты КТ в среде, аналогичной цельной крови человека. Нами был предложен оригинальный метод оценки гемостатического потенциала тромбоцитов КТ, который включает совмещение образца КТ и фильтрованной крови донора, не содержащей тромбоцитов, проведение ТЭГ-исследования исходной крови донора, фильтрованной крови донора и

фильтрованной крови донора, совмещенной с КТ. Методика включает следующие этапы:

1) из исследуемых доз аферезных или пулированных КТ отбирают пробы объемом 100–500 мкл;

2) у доноров той же группы крови, что и у доноров исследуемых КТ, в ходе стандартной процедуры донации забирают кровь в объеме 450 мл в полимерные гемоконтейнеры CPD/PAGGSM с фильтром Leucoflex LXT (Masopharma, Франция). В последующем все дозы консервированной крови подвергают процедуре лейкоредукции (удаление лейкоцитов и тромбоцитов). Отбор проб для исследований осуществляют из гемоконтейнеров с консервированной кровью на этапах до и после лейкоредукции, используя стерилл-коннектор TSCD-II (Terumo BCT, США) и пластиковые контейнеры-спутники объемом 3–4 мл;

3) смешивают фильтрованную кровь доноров и исследуемый образец КТ в соотношении 9:1;

4) отбирают 340 мкл фильтрованной крови доноров, содержащей тромбоциты КТ, в пластиковую одноразовую кювету, добавляют 20 мкл 0,2 М раствора хлористого кальция, проводят стандартное ТЭГ-исследование. Параллельно проводят стандартное ТЭГ-исследование исходной крови тех же доноров (положительный контроль) и фильтрованной крови доноров без тромбоцитов (отрицательный контроль). В исследуемых образцах определяют максимальную амплитуду (МА, мм) и k (фаза усиления, мин.). Параметр k отражает время от начала движений стержня прибора до момента, когда амплитуда тромбоэластограммы составит 20 мм. Параметр МА отражает общие физические свойства сгустка. В тромбоэластографии для характеристики активности тромбоцитарного звена используется МА. При переливании концентратов тромбоцитов пациентам также рекомендуется оценивать параметр k. При увеличении активности тромбоцитов отмечается рост МА и

снижение/укорочение k , при снижении активности тромбоцитов – соответственно падение МА и удлинение k .

В образцах цельной крови с нормальным содержанием тромбоцитов значения МА в норме варьируют от 44 до 65 мм, k – от 2 до 9 мин. В образцах крови доноров, фильтрованной через лейкоцитарно-тромбоцитарный фильтр и практически не содержащей тромбоцитов, значения МА варьируют от 8 до 19 мм, медиана составляет 13 [9; 15] мм, параметр k в 85 % образцов не определяется, что указывает на очень низкую активность тромбоцитов или ее отсутствие. Значения МА и k в образцах фильтрованной крови, совмещенной с КТ, зависит от качества и функциональной активности тромбоцитов (рис. 1);

5) рассчитывают коэффициент восстановления гемостатической функции HR (hemostasis recovery) по формуле:

$$HR = (MA_s - MA_n) / (MA_p - MA_n) \times 100 \%,$$

где MA_s – максимальная амплитуда фильтрованной крови с добавленным КТ (экспериментальный образец), MA_n – максимальная амплитуда фильтрованной крови без тромбоцитов (негативный контроль), MA_p – максимальная амплитуда цельной донорской крови (позитивный контроль);

6) в зависимости от величины коэффициента HR и значений k оценивают гемостатический потенциал КТ. При значениях $HR > 95 \%$ и $k < 4$ мин. гемостатический потенциал КТ считают высоким, при HR от 75 до 95 % и $k < 4$ – приемлемым, при $HR < 75 \%$ или $PR < 95 \%$ и $k > 4$ – низким. КТ с высоким гемостатическим потенциалом рекомендуются для лечебных трансфузий (купирование геморрагического синдрома), КТ с приемлемым гемостатическим потенциалом рекомендуются для профилактических трансфузий, КТ с низким гемостатическим потенциалом не рекомендуются для трансфузий.

В процессе исследования мы сравнивали ПулКТ, полученные через 2 сут. после выделения ТФ, и аферезные КТ, срок хранения которых также составлял 2 сут. По нашим данным, в аферезных КТ концентрация тромбоцитов с гранулами была в среднем в 1,8 раза выше, чем в ПулКТ ($p < 0,05$). Тем не менее аферезные КТ и ПулКТ проявляли сходную функциональную активность при ТЭГ-исследовании (табл. 2). Это может быть связано с повышенным содержанием в ПулКТ тромбоцитов на ранней стадии активации или в состоянии преактивации, с наличием в ПулКТ свободных тромбоцитарных гранул, которые также обладают гемостатической активностью. Была выявлена взаимосвязь между морфофункциональными параметрами тромбоцитов и параметрами ТЭГ: коэффициент корреляции Спирмена между концентрацией тромбоцитов с гранулами в КТ и значениями k и МА составил $-0,392$ ($p=0,006$) и $0,463$ ($p=0,001$), между МФСТ и значениями k и МА – $-0,402$ ($p=0,005$) и $0,496$ ($p=0,001$) соответственно. В образцах с более высоким значением МФСТ отмечаются более высокие значения HR и укорочение параметра k . Можно заключить, что выбранные параметры ТЭГ зависят от качества тромбоцитов КТ, могут характеризовать их функциональный и гемостатический потенциал.

Таблица 2. Оценка гемостатического потенциала концентратов тромбоцитов (КТ) разных типов с помощью тромбоэластографии

Тип образца КТ, совмещенного с фильтрованной кровью доноров	Концентрация тромбоцитов с гранулами, %	HR	k
Концентраты тромбоцитов, полученные путем аппаратного афереза	22 [17; 25]	103 [93; 106]	1,9 [1,7; 2,4]
Концентраты тромбоцитов, полученные путем пулирования тромбоцитов цельной крови (ПулКТ)	40 [32; 45]*	96 [88; 110]	1,8 [1,5; 3,2]
*Относительно аферезных КТ при $p < 0,05$.			

В рамках нашей работы мы проводили ТЭГ-исследование аферезных и ПулКТ, которые использовались в клинической трансфузиологии для купирования или профилактики геморрагического синдрома у пациентов со следующими патологиями: циррозом печени, механической желтухой, энцефалопатиями с септическими осложнениями, трансплантацией сердца, сочетанной цереброваскулярной патологией с септическими осложнениями, ишемией головного мозга, аневризмой грудного отдела аорты. Все примененные дозы КТ не вызывали осложнений после трансфузии. В процессе анализа было установлено: для купирования кровоточивости и получения эффективного прироста тромбоцитов через 24 ч после трансфузии наиболее эффективны КТ с коэффициентом восстановления гемостатической функции NR более 95 % при длительности времени k менее 4 мин. (табл. 3).

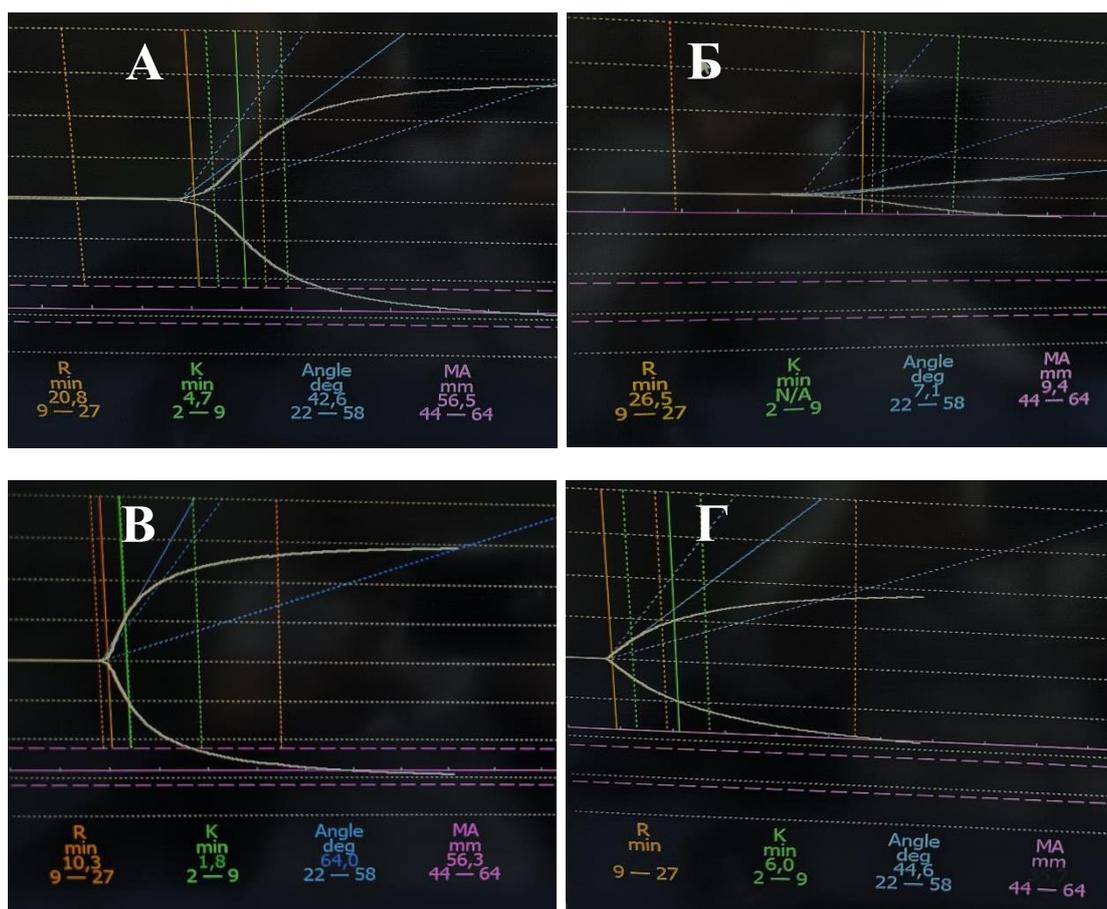


Рис. 1. ТЭГ-кривые, отражающие гемостатическую активность разных образцов крови: А – исходная кровь донора (положительный контроль); Б – кровь донора, фильтрованная через тромбоцитарный фильтр, без тромбоцитов (отрицательный контроль); В – фильтрованная кровь донора, совмещенная с

КТ, имеющим высокий гемостатический потенциал тромбоцитов (HR=99 %, k=1,8 мин.); Г – фильтрованная кровь донора, совмещенная с КТ, имеющим низкий гемостатический потенциал тромбоцитов (HR=67 %, k=6,0 мин.)

Таблица 3. Оценка клинического эффекта КТ с разными параметрами функциональной активности

Номер пробы КТ	Наличие геморрагического синдрома у пациента (по шкале ВОЗ)	Скорректированное число прироста тромбоцитов через 24 ч (норма $\geq 4,5$)	HR	k	Характеристика гемостатического потенциала КТ
1	0	54	110	1,7	Высокий
2	0	21	116	1,2	Высокий
3	2-я степень	19	105	1,6	Высокий
4	0	19	125	1,5	Высокий
5	0	15	102	2,4	Высокий
6	0	12	103	1,8	Высокий
7	1-я степень	9	107	2,8	Высокий
8	1-я степень	9	100	3,2	Высокий
9	0	8	87	1,3	Приемлемый
10	0	4	90	4,2	Низкий
11	0	3	74	1,8	Низкий

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ И РАЗМОРОЗКА ПУЛИРОВАННЫХ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ

На сегодняшний день криоконсервирование тромбоцитов является единственным технологически эффективным и безопасным способом длительного хранения КТ, предназначенных для клинического использования в трансфузиологии. Таким образом, разработка и внедрение эффективных способов криоконсервирования пулированных КТ является высоко актуальной. Особенностью ПулКТ является повышенная реактивность и чувствительность тромбоцитов на фоне снижения других морфофункциональных характеристик. Большинство методик криоконсервирования ПулКТ не учитывают

морфофункциональные особенности тромбоцитов в их составе, не содержат критериев отбора КТ, наиболее пригодных для криоконсервирования, не содержат данных о динамике качества тромбоцитов после размораживания КТ, имеют низкую сохранность жизнеспособных тромбоцитов [19–21]. Нами неоднократно было показано: комбинация проникающих и непроникающих криопротекторов (диметилсульфоксид + декстран) является весьма эффективным для криоконсервирования и криохранения тромбоцитов, полученных путем аппаратного афереза [3, 10]. В данной методике после разморозки происходит разбавление криопротектора в среде с тромбоцитами с помощью аутологичной плазмы. В работе с ПулКТ собственная плазма доноров изначально сильно разведена консервирующими растворами (в 2,5–3,0 раза), поэтому не исключено, что разведение размороженных ПулКТ в ряде случаев будет более эффективным с использованием аллогенной плазмы, из числа доз свежзамороженной бесклеточной плазмы (СЗП). Оценку эффективности разморозки ПулКТ нужно также проводить под контролем микроскопических методик исследования и тромбоэластографии.

Нами разработана методика криоконсервирования и разморозки ПулКТ, позволяющая сохранить не менее 60 % от исходного содержания тромбоцитов с гранулами, которая включает морфофункциональное и тромбоэластографическое исследование ПулКТ до заморозки с целью отбора наиболее пригодных ПулКТ, криоконсервирование ПулКТ с использованием комбинированного криопротектора на основе диметилсульфоксида (ДМСО) и декстрана, разморозку тромбоцитов ПулКТ и разведение их аутологичной бесклеточной средой, выделенной из ПулКТ, или аллогенной свежзамороженной плазмой в соотношении 1:4 для немедленного использования ПулКТ или в соотношении 1:9 для использования ПулКТ в течение 1 сут. Методика содержит следующие этапы:

1) ПулКТ готовят из тромбоцитных фракций, выделенных из цельной крови доноров, по стандартной методике с использованием лейкофилтрации (см. выше);

2) проводят морфофункциональное и тромбоэластографическое исследование ПулКТ для определения доз, пригодных для криоконсервирования. Для сохранения 60 % и более тромбоцитов с гранулами (биологически полноценные тромбоциты) необходимо отбирать ПулКТ со значением адгезивной активности тромбоцитов (ААТ) не менее 20 %, уровня тромбоцитов, богатых гранулами (ТБГ) – не менее 8 %, уровня тромбоцитов с выраженными повреждениями мембран (ТПМ) – не более 40 %, с нормальной или повышенной скоростью адгезии тромбоцитов на стекле, со значением максимальной амплитуды не менее 50 мм, с высокой пероксидазной активностью тромбоцитов. При криоконсервировании ПулКТ со значением ААТ менее 20 %, уровня ТБГ – менее 8 %, уровня ТПМ – более 40 %, с высокой, очень высокой или низкой скоростью адгезии тромбоцитов на стекле, со значением максимальной амплитуды менее 50 мм, с низкой пероксидазной активностью тромбоцитов не удастся добиться высокой сохранности тромбоцитов ПулКТ в процессе криоконсервирования и разморозки, наблюдается высокий риск спонтанной активации тромбоцитов после разморозки. Морфофункциональный анализ проводят с помощью метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов, включающего окраску витальными флуорохромными красителями и анализ окрашенных тромбоцитов во флуоресцентном микроскопе. Тромбоциты с гранулами являются структурно и функциональными клетками в составе популяции тромбоцитов, наличие тромбоцитов с гранулами определяет общий биологический и функциональный потенциал КТ. ТБГ являются наиболее устойчивыми к действию ДМСО и наиболее жизнеспособными в популяции тромбоцитов с гранулами, определяют интенсивность их функционального ответа. ТПМ имеют низкую или очень низкую яркость свечения цитоплазмы при витальном окрашивании. ТПМ не содержат гранул, не обладают функциональной активностью, при этом

способны оказывать повреждающее действие на клетки крови, сосуды и другие ткани [6]. Скорость адгезии тромбоцитов на стекле отражает функциональные особенности тромбоцитов и их склонность к спонтанной активации или гиперактивации. Скорость адгезии тромбоцитов на стекле определяется по времени, в течение которого тромбоцит необратимо меняет форму и выбрасывает гранулы в процессе контакта со стеклом. Параметр «максимальная амплитуда» используется в тромбоэластографии для характеристики активности тромбоцитарного звена. При увеличении активности тромбоцитов отмечается рост МА. Для оценки МА образцы ПулКТ совмещают с кровью доноров, не содержащей тромбоцитов, и проводят тромбоэластографию. Пероксидазная активность тромбоцитов ПулКТ зависит от объема цельных везикул (гранул) в их составе и визуально определяется по образованию пузырьков газа на стенке флакона с ПулКТ в присутствии 30–40 % ДМСО. Высокие концентрации ДМСО вызывают растворение тромбоцитарных мембран и массовое высвобождение их компонентов. Гранулы биологически полноценных тромбоцитов содержат значительное количество пероксидаз, которые вызывают процессы газообразования. В цельной плазме пероксидазы нейтрализуются плазменным ферментом каталазой, в ПулКТ объем плазмы редуцирован в 3–4 раза, что позволяет наблюдать пероксидазную активность в ПулКТ со значениями Dтр.гр. и ААТ 20 % и выше, ТБГ – 8 % и выше (рис. 2, А). В ПулКТ с низким качеством тромбоцитов пероксидазная активность в условиях 30–40 % ДМСО визуально не наблюдается (рис. 2, Б). Таким образом, визуальная оценка пероксидазной активности тромбоцитов ПулКТ также может быть критерием отбора ПулКТ для криоконсервирования;

3) разведение тромбоцитсодержащей части после разморозки ПулКТ необходимо для снижения токсического эффекта криопротекторов и предотвращения быстрого разрушения тромбоцитов. Размороженные ПулКТ рекомендуется разводить СЗП при назначении трансфузии КТ пациентам с клинически выраженными кровотечениями 2–3-й степени по шкале ВОЗ в сочетании с нарушениями плазменного звена гемостаза или обширной

кровопотере. Для ресуспендирования в СЗП рекомендуется отбирать дозы ПулКТ с наименьшим уровнем ТПМ. Размороженные ПулКТ рекомендуется разводить аутологичной при назначении трансфузии КТ пациентам с клинически выраженными кровотечениями 1–2-й степени или при профилактических трансфузиях;

4) отобранные ПулКТ центрифугируют с ускорением от 1100 до 1400 g от 7 до 12 мин. для разделения ПулКТ на тромбоцитсодержащую часть (объем 10–20 мл) и аутологичную бесклеточную среду (объемом 180–280 мл);

5) исходный комбинированный криопротектор, содержащий 55 % ДМСО и 5 % декстрана 40, разводят криопротектор аутологичной бесклеточной средой, выделенной из ПулКТ, до конечной концентрации ДМСО 10–12 %;

6) в тромбоцитсодержащую часть вносят равный объем раствор с 10 % ДМСО и декстраном до конечной концентрации ДМСО в тромбоцитсодержащей части 5–6 %;

7) тромбоцитсодержащую часть с криопротектором ДМСО-декстраном и аутологичную бесклеточную среду замораживают со скоростью 1–3°/мин. при -80–100 °С и хранят их при -85–196 °С;

8) размораживание ПулКТ проводят путем нагревания в водяной бане при 32–36 °С в течение 2–10 мин. Для ресуспендирования тромбоцитов тромбоцитсодержащую часть разводят аутологичной бесклеточной средой, выделенной из ПулКТ, или аллогенной свежезамороженной плазмой в соотношении 1:4 для немедленного использования ПулКТ или в соотношении 1:9 для использования ПулКТ в течение суток.

СЗП может быть применена в тех случаях, когда по трансфузиологическим показаниям пациенту назначается доза СЗП для коррекции плазменного звена гемостаза. Если трансфузионная тактика не подразумевает использование СЗП, более оправданно использовать аутологичную среду, выделенную из ПулКТ.

При разведении размороженных ПулКТ аутологичной средой или СЗП до концентрации ДМСО 0,5–0,6 % (соотношение тромбоцитсодержащей части и

разводящей среды 1:9) морфофункциональный статус тромбоцитов значимо не меняется в течение 2–3 ч, при разведении до концентрации ДМСО 1,0–1,5 % (соотношение тромбоцитсодержащей части и разводящей среды 1:4) морфофункциональный статус не менялся в течение 30 мин., затем наблюдается его постепенное снижение (рис. 3). Таким образом, в условиях переливания криоконсервированных ПулКТ сразу после их разморозки достаточно разведение размороженных тромбоцитов аутологичной средой или СЗП в соотношении 1:4. Если после разморозки ПулКТ требуется транспортировка или другие процедуры, рекомендуется разведение размороженных тромбоцитов аутологичной средой или СЗП в соотношении 1:9. Для сохранения 60 % и более тромбоцитов с гранулами необходимо отбирать ПулКТ со значением ААТ не менее 20 %, ТБГ – не менее 8 %, ТПМ – не более 40 %, с нормальной или повышенной скоростью адгезии тромбоцитов на стекле, со значением максимальной амплитуды не менее 50 мм при разведении после разморозки аутологичной средой или СЗП (табл. 4). В среднем тромбоциты, разведенные после криоконсервирования СЗП, имеют более высокие параметры функциональной активности (ААТ, МА, скорость адгезии на стекле), чем тромбоциты, разведенные аутологичной средой из ПулКТ. Поэтому размороженные ПулКТ рекомендуется разводить СЗП при назначении трансфузии КТ пациентам с клинически выраженными кровотечениями 2–3-й степени по шкале ВОЗ в сочетании с нарушениями плазменного звена гемостаза или обширной кровопотерей. Для ресуспендирования в СЗП рекомендуется отбирать дозы ПулКТ с наименьшим уровнем ТПМ. Размороженные ПулКТ рекомендуется разводить аутологичной при назначении трансфузии КТ пациентам с клинически выраженными кровотечениями 1–2-й степени или при профилактических трансфузиях.

Таблица 4. Влияние морфофункциональных параметров исходных ПулКТ на сохранность тромбоцитов после криоконсервирования и разморозки в аутологичной среде

Параметры	ПулКТ № 1	ПулКТ № 2	ПулКТ № 3	ПулКТ № 4	ПулКТ № 5
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

Дтр. гр., %	До криоконсервирования	16	22	21	24	17
	После криоконсервирования	5	15	15	6	5
ААТ, %	До криоконсервирования	15	21	21	22	17
	После криоконсервирования	5	15	15	6	5
ТБГ, %	До криоконсервирования	3	8	9	4	8
	После криоконсервирования	1	6	6	1	2
ТПМ, %	До криоконсервирования	49	39	35	44	51
	После криоконсервирования	67	50	55	60	68
Скорость адгезии тромбоцитов на стекле, мин.	До криоконсервирования	32 (низкая)	12 (нормальная)	8 (повышенная)	5 (высокая)	3 (очень высокая)
	После криоконсервирования	40 (низкая)	16 (нормальная)	7 повышенная	3 (очень высокая)	2 (очень высокая)
Максимальная амплитуда	До криоконсервирования	42	52	60	46	40
	После криоконсервирования	25	42	43	40	39
Пероксидазная активность тромбоцитов ПулКТ до криоконсервирования		низкая	высокая	высокая	высокая	низкая
Сохранность общего числа тромбоцитов (в процентах от исходного содержания)		98	99	99	98	99
Сохранность тромбоцитов с гранулами (в процентах от исходного содержания)		26	69	70	37	33
Заключение		ПулКТ не пригоден для криоконсервирования	ПулКТ пригоден для криоконсервирования	ПулКТ пригоден для криоконсервирования	ПулКТ не пригоден для криоконсервирования	ПулКТ не пригоден для криоконсервирования

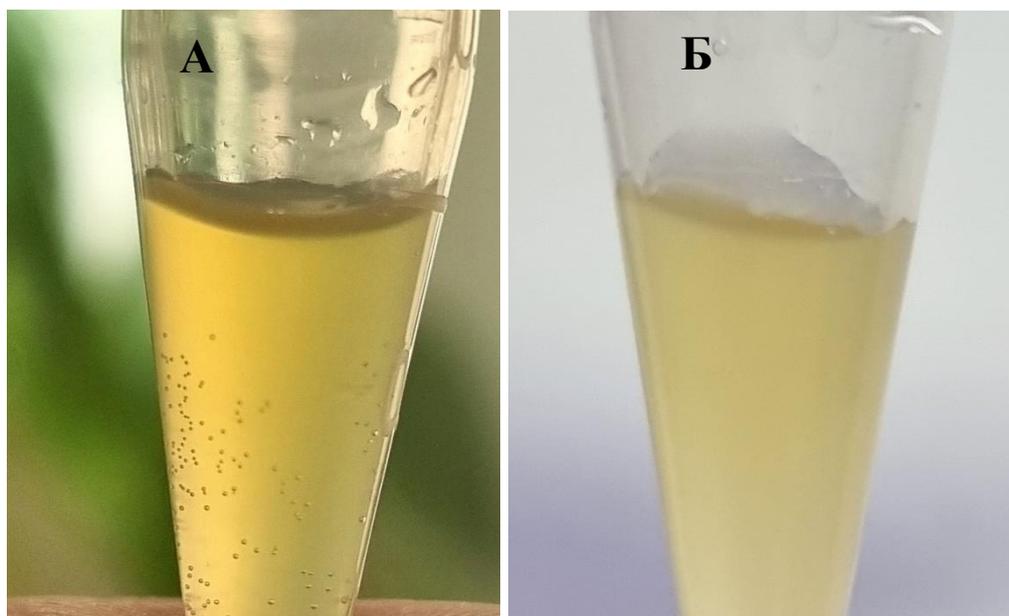


Рис. 2. Визуальная оценка пероксидазной активности тромбоцитов ПулКТ в условиях 40 % ДМСО: А – ПулКТ со значениями Дтр. гр.=25 %, ААТ=24 %, ТБГ=10 % (высокая пероксидазная активность, выделение пузырьков газа); Б – ПулКТ, содержащий Дтр. гр.=14 %, ААТ=12 %, ТБГ=2 % (низкая пероксидазная активность, пузырьков газа нет)

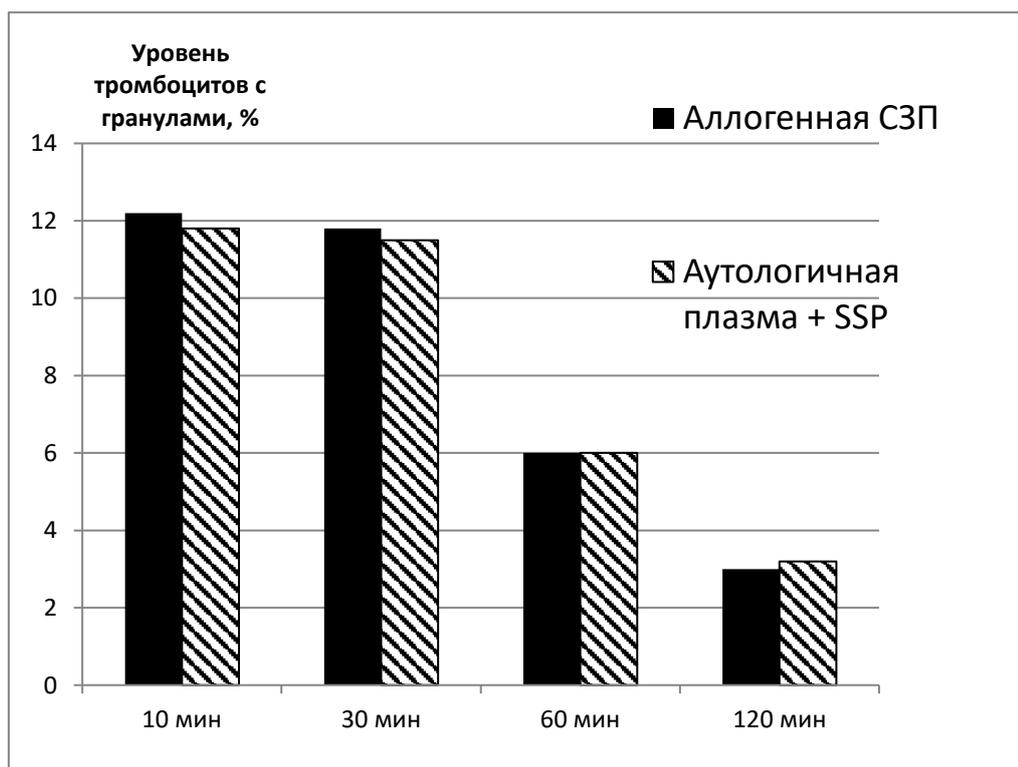


Рис. 3. Изменение содержания тромбоцитов с гранулами в размороженных ПулКТ, разведенных аутологичной бесклеточной средой из ПулКТ (аутологичная плазма + SSP) и аллогенной СЗП, с остаточной концентрацией ДМСО 1,0–1,5 %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заготовка пулированных концентратов тромбоцитов значительно расширяет возможности производственной трансфузиологии, позволяет эффективно реализовать донорский потенциал с получением трех компонентов из стандартной дозы цельной крови. Длительное хранение ПулКТ позволяет увеличить стратегические запасы тромбоцитных компонентов и эффективно проводить их карантинизацию. Большое значение имеет предварительный анализ тромбоцитов в составе тромбоцитных фракций для повышения качества готовых ПулКТ. Процедура пулирования, лейкоредукции, разведения плазмазамещающим раствором и патоген-инактивация значимо не влияют на качество тромбоцитов ПулКТ. При этом важно оценивать структурную целостность и функциональную активность тромбоцитов ПулКТ как при коротком хранении, так и при криоконсервировании. Метод тромбоэластографии с использованием крови доноров позволяет оценить гемостатический потенциал аферезных и пулированных КТ, выбирать КТ для лечебных и профилактических трансфузий. При разведении размороженных ПулКТ после криоконсервирования могут быть использованы как аутологичная среда ПулКТ, так и аллогенная свежезамороженная плазма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азимова М. Х., Галстян Г. М., Гапонова Т. В., Карякин А. В., Крюкова Г. Н., Нехаевская С. С. Биохимические параметры концентратов донорских тромбоцитов при хранении после проведения инактивации патогенов с помощью технологии амотосален + ультрафиолетовое облучение спектра А *in vitro*. Гематология и трансфузиология. 2017; 62(1): 37-40.
2. Буланов А. Ю., Прасолов Н. В., Яцков К. В. Тромбоэластография в практике анестезии и интенсивной терапии в акушерстве. Клинические рекомендации. Протоколы лечения. – М., 2016.
3. Высочин И. В., Кобзева Е. Н., Макаров М. С., Хватов В. Б., Костин А. И., Серых А. В., Аристакесян А. А., Роганова Е. А. Клинико-экономическое обоснование оценки индивидуальной совместимости криоконсервированных тромбоцитов и тромбоцитных концентратов перед трансфузией реципиентам. Трансфузиология. 2016; 17(3): 57-74.
4. Карпова О. В., Ройтман Е. В., Колесникова И. М., Трахтман П. Е., Румянцев С. А. Метаболические изменения при хранении тромбоцитных концентратов, заготовленных разными методами. Трансфузиология. 2014; 15(2): 75-76.
5. Макаров М. С., Кобзева Е. Н., Высочин И. В., Боровкова Н. В., Хватов В. Б. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения. Альманах клинической медицины. 2014; (30): 83-87.
6. Макаров М. С. Физиологическое и прогностическое значение тромбоцитов без гранул. Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2018; 3(26): 32-38.
7. 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 РФ».
8. Рожков Е. В., Кожемяко О. В., Понасенко М. А., Карасева И. А., Рожкова Н. С., Мадзаев С. Р., Жибурт Е. Б. Совершенствование производства концентрата пулированных патогенредуцированных тромбоцитов. Трансфузиология. 2022; 23(1): 16-21.
9. Сухарева А. С., Кутефа Е. И., Хромова Е. А., Кожемяко О. В. Валидация получения пулированного концентрата тромбоцитов. Трансфузиология. 2016; 17(2): 41-46.
10. Хубутя М. Ш., Высочин И. В., Кобзева Е. Н., Макаров М. С., Тюрин И. А., Ключев А. Е., Стрельникова Т. А., Хватов В. Б. Производство и клиническое применение криоконсервированных тромбоцитов и тромбоцитных концентратов. Вестник службы крови России. 2015; (3): 45-51.

11. Хамитов Р. Г., Гаврилей А. В., Дрожжина И. Е., Костикова О. Н., Кочеткова М. А., Медянцева Л. Г., Рассохина О. И., Таскаева Е. И., Шестаков Е. А., Жибурт Е. Б. Трудности внедрения пулированных тромбоцитов. *Тромбоз, гемостаз и реология*. 2022; (4): 22–29.
12. Чечеткин А. В., Алексеева Н. Н., Старицына Н. Н., Киселева Е. А., Гришина Г. В., Тарковская Л. Р. Целесообразность включения метаболических компонентов различного механизма действия в состав добавочных растворов для хранения тромбоцитов. *Трансфузиология*. 2021; 22(1): 71-78.
13. Garraud O., Hamzeh-Cognasse H., Chalayer E., Duchez A. C., Tardy B., Oriol P., Haddad A., Guyotat D., Cognasse F. Platelet transfusion in adults: An update. *Transfus Clin Biol*. 2023; 30(1):147-165. [https://doi: 10.1016/j.tracli.2022.08.147](https://doi.org/10.1016/j.tracli.2022.08.147)
14. Gavva C., Barroso J., Gernsheimer T., Metcalf R. A., Warner P., Pagano M. B. Response to random apheresis platelets versus HLA-selected platelets versus pooled platelets in HLA-sensitized patients. *Transfusion*. 2019; 59(7): 2276-2281. doi: 10.1111/trf.15333.
15. Gulliksson H. Storage of platelets in additive solutions: the effect of citrate and acetate in in vitro studies. *Transfusion*. 1993; 33: 301-303.
16. Johnson L., Winter K. M., Kwok M., Reid S., Marks D. C. Evaluation of the quality of blood components prepared using the Reveos automated blood processing system. *Vox Sang*. 2013; 105(3): 225-235. doi: 10.1111/vox.12051.
17. Pérez Aliaga A.I., Labata G., Aranda A., Cardoso M., Puente F., Domingo J. M., Garcés C. Improvement of blood processing and safety by automation and pathogen reduction technology. *Transfus Med Hemother*. 2021; 48(5): 290-297. doi: 10.1159/000516696.
18. Rikkert L. G., Coumans F. A. W., Hau C. M., Terstappen L. W. M. M., Nieuwland R. Platelet removal by single-step centrifugation. *Platelets*. 2021; 32(4): 440-443. doi: 10.1080/09537104.2020.1779924
19. Valeri C. R., Macgregor H., Ragno G. Correlation between in vitro aggregation and thromboxane A2 production in fresh, liquid-preserved, and cryopreserved human platelets: effect of agonists, pH, and plasma and saline resuspension. *Transfusion*. 2005; 45: 596-603.
20. Tynngård N., Bell A., Gryfelt G., Cvetkovic S., Wikman A., Uhlin M., Sandgren P. Cryopreservation of buffy coat derived platelets: Paired in vitro characterization using uncontrolled versus controlled freezing rate protocols. *Transfusion*. 2021; 61(2): 546-556.
21. Waters L., Padula M. P., Marks D. C., Johnson L. Calcium chelation: a novel approach to reduce cryopreservation-induced damage to frozen platelets. *Transfusion*. 2020; 60(7): 1552-1563.