

НОВЫЙ ЛАБОРАТОРНЫЙ МАРКЕР КАЧЕСТВА КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ

Касьянов А.Д.¹, Гришина Г.В.¹, Голованова И.С.¹, Тарковская Л.Р.¹,
Ласточкина Д.В.¹, Смирнова О.А.¹, Матвиенко О.Ю.¹, Круглов А.А.¹,
Бессмельцев С.С.^{1,2}

*¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»,*

Санкт-Петербург

Россия, 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16,

тел. (812) 309-79-81,

*²Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения
высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения*

Российской Федерации

Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

тел: +7 (812) 309-79-81 доб. 102

Резюме. Требования к качеству тромбоцитов, предназначенных для предотвращения кровотечения, остановки кровотечения или ускорения заживления ран, потенциально сильно различаются. Концентраты тромбоцитов с низкой концентрацией тромбоцитарных микрочастиц целесообразно использовать для терапии пациентов онкологического и гематологического профиля. Напротив, для хирургических или травматологических пациентов, где имеет место острая кровопотеря, трансфузии концентратов тромбоцитов, содержащих предварительно активированные тромбоциты, будут иметь высокую эффективность ввиду реализации повышенной гемостатической функции.

Цель исследования. Изучение влияния среды хранения, методов дополнительной обработки, температурного режима хранения на статус активации тромбоцитов.

Материалы и методы. Исследован статус активации по тромбоцитарным микрочастицам 56 аферезных концентратов тромбоцитов, заготовленных с использованием аппаратов для цитафереза Trima Accel («Terumo BCT», США) и MCS+ (Haemonetics Corporation, США) на сроках хранения. В работе использованы гематологические, биохимические, физико-химические, иммунологические и статистические методы исследования.

Результаты. Данные исследования вносят вклад в понимание биологических изменений в концентратах тромбоцитов при заготовке, проведении дополнительной обработки, хранении в различных температурных условиях.

Заключение. Комплексная оценка качественных изменений концентратов тромбоцитов с учетом статуса активации дает возможность персонализированного использования заготовленных компонентов донорской крови.

Ключевые слова: концентрат тромбоцитов; микрочастица; статус активации; проточная цитометрия; оценка качества

NEW LABORATORY QUALITY MARKER OF PLATELET CONCENTRATES

Kasyanov A.D.¹, Grishina G.V.¹, Golovanova I.S.¹, Tarkovskaya L.R.¹,
Lastochkina D.V.¹, Smirnova O.A.¹, Matvienko O.Yu.¹, Kruglov A.A.¹,
Bessmeltsev S.S.^{1,2}

*¹Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Saint
Petersburg, Russia*

*²Federal State Budgetary Institution of Higher Education "North-Western State
Medical University named after I.I. Mechnikov" of the Ministry of Health of the
Russian Federation*

Summary. The quality requirements for platelets intended to prevent bleeding, stop bleeding, or accelerate wound healing are potentially very different. Platelets intended to prevent bleeding, stop bleeding, or accelerate wound healing are potentially very different. Platelet concentrates with a low concentration of platelet microparticles is advisable to be used for the therapy of patients of oncological and hematological profile. In contrast, for surgical or traumatological patients where acute blood loss takes place, transfusions of platelets intended to prevent bleeding, stop bleeding, or accelerate wound healing are potentially very different. Platelet concentrates containing pre-activated platelets will have high efficiency due to the implementation of the increased hemostatic function.

Purpose of the study. Study of the effect of storage environment, additional processing methods, and storage temperature on platelet activation status.

Materials and methods. The activation status of 56 platelet concentrates prepared using Trima Accel (Terumo BCT, USA) and MCS+ (Haemonetics Corporation, USA) citapheresis devices was studied during storage. The study used hematological, biochemical, physical-chemical, immunological, and statistical research methods.

Results. These studies contribute to understanding the biological changes in platelet concentrates during harvesting, additional processing, and storage under various temperature conditions.

Conclusion. A comprehensive assessment of the quality changes in platelet concentrates, taking into account the activation status, makes it possible to personalize the use of prepared donor blood components.

Keywords: platelet concentrate; microparticle; activation status; flow cytometry; quality assessment

Введение.

Требования к качеству тромбоцитов, предназначенных для предотвращения кровотечения, остановки кровотечения или ускорения заживления ран, потенциально различаются [1]. Может ли один измеряемый показатель описать качество тромбоцитов для всех видов применения? Положительный ответ на этот вопрос содержится в работе, в которой измерение содержания микрочастиц в образцах тромбоцитов представлено в качестве универсальной характеристики качества для производства, хранения, оценки жизнеспособности, функции и совместимости тромбоцитов [2].

Предполагается, что большинство доноров сдают жизнеспособные тромбоциты и что жизнеспособность теряется из-за изменений во время хранения (storage lesion); при этом вариабельность доноров не считается основным способствующим этому фактором [3]. Из этого следует, что пациентам, нуждающимся в жизнеспособных тромбоцитах, которые остаются в кровообращении в течение длительного времени, необходимо переливать компоненты с минимальным сроком хранения. Такие параметры, как экспрессия CD62, реакция на АДФ или гипотонический шок, измеряются, потому что существует физиологическое обоснование изменений этих показателей, которые происходят как с активацией, так и во время хранения тромбоцитов. Показано, что высвобождение микрочастиц тромбоцитами следует за активацией и увеличивается по мере старения тромбоцитарных компонентов [4]. Таким образом, качество тромбоцитов оценивается с точки

зрения производства и регулируется для обеспечения последовательности и стабильности производственного процесса [5, 6].

При увеличении срока хранения наблюдаются дополнительные изменения, которые становятся более важными, поскольку тромбоциты, протестированные на бактериальную контаминацию или патогенредуцированные, могут храниться в течение 7 дней. Некоторые чувствительные маркеры начинают давать сбой при выраженных последствиях в результате хранения. Однако корреляция между различными тестами *in vitro* усиливается при включении данных, выходящих за пределы сильно варьирующегося диапазона нормы. Поэтому неудивительно, что эти показатели часто являются неточными предикторами клинического исхода [7] и что исследования не всегда выявляют высокую корреляцию между параметрами *in vitro* и исходом *in vivo* [8].

Из-за сниженной жизнеспособности предварительно активированные тромбоциты не рекомендуются для длительного хранения или профилактических трансфузий у онкологических больных [9]. Напротив, считается, что предварительно активированные тромбоциты, обладающие повышенной гемостатической активностью, эффективны для остановки острого кровотечения, что особенно важно для пациентов хирургического профиля [10].

Качество тромбоцитов должно соответствовать задаче переливания. Следовательно, идеальный параметр качества для прогнозирования функционирования тромбоцитов после переливания должен позволять различать покоящиеся/жизнеспособные и предварительно активированные/высокофункциональные тромбоциты с одинаковой достоверностью по всему спектру жизнеспособности–функциональности.

Показатель содержания микрочастиц как фрагментации и гетерогенности тромбоцитов может соответствовать требованиям к универсальному показателю качества для производства, хранения, жизнеспособности, функции и совместимости тромбоцитов [11, 12]. Гетерогенность концентратов тромбоцитов (КТ) с учетом степени активации по микрочастицам дает

возможность корректировать процесс заготовки, а также дифференцировать КТ для профилактических и лечебных трансфузий. Вопрос о степени безопасности и эффективности переливания тромбоцитов для предупреждения кровотечения включен в число приоритетных направлений исследований. Тем не менее, сохраняется актуальность разработки новых подходов к хранению и обеспечению системы безопасности трансфузий КТ, т.к. данные о количестве тромбоцитов не характеризуют их функциональное состояние [13].

Цель исследования.

Изучение влияния среды хранения, методов дополнительной обработки, температурного режима хранения на статус активации тромбоцитов.

Материалы и методы.

Объектом исследования являлись образцы концентратов тромбоцитов (КТ), полученные методом афереза у активных (кадровых) доноров с использованием аппаратов для цитафереза Trima Accel (Terumo BCT, США) и MCS+ (Haemonetics Corporation, США). Тромбоциты заготавливались на 100% плазме и добавочном растворе SSP+ (ДР) в соотношении 70% ДР и 30% нативной плазмы.

Для определения количества тромбоцитов использовали автоматический гематологический анализатор SMART 5 (URIT MEDICAL ELECTRONIC CO., LT, Китай). Содержание тромбоцитарных микрочастиц (ТМЧ) определяли методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) путем бокового рассеяния излучения фиолетового лазера. Согласно используемого протокола для каждого образца набиралось 10^6 событий. Идентификация ТМЧ производилась с применением моноклональных антител Anti-Hu CD41 – APC (Clone MEM-06) к поверхностным маркерам тромбоцитов [14].

Лабораторные исследования тромбограммы, метаболизма, гемостатического и прокоагулянтного потенциалов проводились на 1 и 5 дни хранения. Исследование агрегационных свойств тромбоцитов проводилось по методу Борна на 4-х канальном анализаторе агрегации тромбоцитов АТ-2 (НПФ

«МедТех», Россия) [15]. Для оценки прокоагулянтной активности ТК был использован метод тромбозластографии [16].

Лейкоредукция на аппарате «MCS+» осуществлялась методом фильтрации. С целью удаления лейкоцитов использовали встроенные лейкоцитарные фильтры: 997CF-E для получения концентрата тромбоцитов, заготовленных на плазме, и 999F-E для сбора концентратов тромбоцитов, заготовленных на добавочном растворе. Аппарат «Trima Accel» снабжен системой LRS (leukocyte reduce system) с целью удаления лейкоцитов за счет центробежной силы. Облучение концентратов тромбоцитов проводили на аппарате «Ардок-1» (НПП ВЭЛИТ, Россия). Доза облучения при облучении в течение 45 минут составляет не менее 25 Гр в центральной плоскости лотка и до 30-32 Гр в верхней и нижней плоскости лотка. В соответствии с постановлением правительства РФ №641 «Об утверждении правил заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и ее компонентов» доза рентгеновского или гамма- облучения должна составлять 25-50 Грей. С целью патогенредукции использовали систему Mirasol (Terumo BCT, (Бельгия). В ходе исследования использовался регламентируемый режим хранения (температура $+22 \pm 2$ °C при постоянном помешивании в перемешивателе тромбоцитов AP-48 L (Presvac, Аргентина) и гипотермический $+4 \pm 2$ °C в медицинском холодильнике ХК-250-1 («Pozis», Россия.)

Для лабораторного анализа соблюдались требования стандартизации и метрологии, применяли сертифицированное оборудование и реагенты. Результаты исследования представлены в виде медианы (Me), первого и третьего квартиля (Q1 – Q3). Для оценки различий между двумя зависимыми группами использовали критерий Вилкоксона. Статистически значимые различия определялись при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от вида добавочного раствора

Все исследуемые концентраты тромбоцитов были заготовлены методом автоматического афереза согласно установленным требованиям. Результаты тромбограммы, измерений количества тромбоцитов, среднего объема и уровня ТМЧ в день заготовки и на 5 сутки хранения представлены в таблице 1.

Таблица 1

Динамика концентрации тромбоцитов, среднего объема тромбоцитов и концентрации тромбоцитарных микрочастиц на сроках хранения

Параметр, день	Me (Q ₁ – Q ₃)		p
	Плазма (1 группа)	SSP+ (2 группа)	
Тромбоциты (10 ⁹ /л), 1 день	887 (745-1057)	1047,0 (908,0-1376,0)	0,013
Тромбоциты (10 ⁹ /л), 5 день	882 (700,5-1030)	1050,0 (921,5-1271)	0,017
p	0,443	0,178	
MPV (фл), 1 день	8,9 (8,3-9,5)	8,4 (7,9-9,1)	0,066
MPV (фл), 5 день	9,2 (8,5-9,6)	9,0 (8,3-9,6)	0,477
p	0,002	0,003	
ТМЧ, 1 день	7364,5 (5201,7-11461,2)	13451,0 (7607,5-20506,7)	0,009
ТМЧ, 5 день	30579,0 (26303,0-39832,0)	44163,0 (29482,5-66267,5)	0,012

Количество тромбоцитов в обеих группах в процессе хранения значительно не изменялось. Вместе с тем необходимо отметить изначально большее количество тромбоцитов во II группе, которое значительно сохранялось к концу срока наблюдения. За время хранения средний объем тромбоцитов значительно увеличился в обеих группах. Межгрупповые различия по этому показателю на сроках наблюдения не выявлены. Обнаруженные изменения размеров клеток в двух средах хранения укладывались в границы физиологической нормы. Показано, что абсолютные значения MPV клеток в любые сроки хранения в растворе SSP+ оказались меньшими, чем у КТ на плазме. Эти данные позволяют предположить замедление процессов старения клеток в присутствии добавочного раствора SSP+. В обеих группах наблюдалось значимое

увеличение количества ТМЧ. Необходимо отметить значимую разницу в количестве ТМЧ между группами как в начале наблюдения, так и в конце эксперимента.

Изменения метаболизма тромбоцитов на сроках наблюдения представлены в таблице 2.

Таблица 2

Динамика показателей метаболизма тромбоцитов на сроках хранения

Параметр, день	Me (Q ₁ – Q ₃)		p
	Плазма (1 группа)	SSP+ (2 группа)	
pH, 1 день	6,98 (6,96-7,02)	6,99 (6,96-7,06)	0,477
pH, 5 день	7,11 (7,03-7,21)	7,01 (6,75-7,07)	0,019
p	0,012	0,221	
Глюкоза (ммоль/л), 1 день	20,2 (19,6-21,2)	8,6 (7,9-9,6)	<0,0001
Глюкоза (ммоль/л), 5 день	16,1 (13,7-18,7)	4,7 (3,8-6,3)	0,005
p	0,012	0,001	
Лактат (ммоль/л), 1 день	1,7 (1,2-2,0)	0,5 (0,3-0,7)	0,002
Лактат (ммоль/л), 5 день	8,4 (6,9-9,2)	8,0 (6,1-9,8)	0,976
p	0,012	0,001	

Значение pH во время хранения в I группе имело тенденцию, а во второй значимо увеличилось к концу срока наблюдения. Межгрупповые различия в начале эксперимента отсутствовали, на 5 день наблюдения во второй группе pH был значимо ниже. Содержание глюкозы в I группе в начале наблюдения ожидаемо превышало значение этого показателя во второй группе, значимость различий сохранялась и в конце эксперимента. Вместе с тем необходимо отметить различия в интенсивности потребления глюкозы (I группа -20,3%, II группа – 45,7%). Содержание лактата значимо возрастало в процессе хранения в обеих группах. Начальная концентрация лактата была выше в I группе. К концу эксперимента значимые различия по этому показателю между группами отсутствовали.

Данные об изменениях агрегационной активности представлены в таблице 3.

Таблица 3

Динамика показателей агрегационной активности тромбоцитов на сроках хранения

Параметр, день	Me (Q ₁ – Q ₃)		p
	Плазма	SSP+	
Агрегация с АДФ, МА (%), 1 день	33,6 (27,05-46,05)	8,0 (1,3-11,2)	0,0002
Агрегация с АДФ, МА (%), 5 день	1,8 (1,0-2,65)	0,8 (0,6 – 1,2)	0,028
p	0,008	0,012	
Агрегация с коллагеном, МА (%), 1 день	57,5 (51,5-62,4)	46,1 (23,0-54,9)	0,087
Агрегация с коллагеном, МА (%), 5 день	1,7 (0,9-2,05)	0,9 (0,8-1,2)	0,095
p	0,00008	0,0004	
Агрегация с ристомидином, МА (%), 1 день	56,4 (53,1-68,7)	78,0 (70,0-79,0)	0,003
Агрегация с ристомидином, МА (%), 5 день	36,9 (16,5-57,0)	68,5 (55,7-71,0)	0,0098
p	0,088	0,022	

При хранении в обеих группах наблюдалось статистически значимое снижение агрегации тромбоцитов под действием индуктора АДФ, как с добавочным раствором ($p=0,012$), так и с плазмой ($p=0,008$), достигшее максимума к концу срока наблюдения. Сохранялось различие между двумя группами на пятый день хранения ($p=0,028$). Снижение агрегации тромбоцитов с ристомидином может свидетельствовать о разрушении их мембран. Отличия между КТ, заготовленным на добавочном растворе и КТ, заготовленным на плазме, были статистически значимыми как на начальном этапе хранения ($p=0,003$), так и на 5-й день хранения ($p=0,0098$), причем агрегация с ристомидином была выше у КТ, заготовленных на добавочном растворе. Уменьшение агрегации в процессе хранения было невелико и являлось статистически не значимым для КТ, заготовленным на плазме ($p=0,088$), но оказалось статистически значимым для КТ на SSP+ ($p=0,022$). Тем не менее,

показатели МА агрегации с ристомиином были достаточно высокими для заготовки на SSP+, что свидетельствует о хорошей сохранности внешней оболочки тромбоцитов в течение всего срока хранения.

Для оценки прокоагулянтной активности КТ был использован метод тромбоэластографии (таблица 4).

Таблица 4

Динамика коагуляционной активности концентратов тромбоцитов при хранении

Параметр/День	Ме (Q ₁ – Q ₃)		р
	Плазма	SSP+	
R (мин), 1 день	6,5 (6,0-8,05)	7,6 (7,3-8,9)	0,184
R (мин), 5 день	10,3 (8,2-11,25)	9,8 (8,6-11,4)	1,0
р	0,003	0,047	
G (дин/сек), 1 день	22,6 (19,4-27,4)	17,1 (12,7-18,5)	0,006
G (дин/сек), 5 день	19,7 (17,25-22,1)	12,2 (10,4-13,6)	0,002
р	0,094	0,022	
МА (мм), 1 день	82,1 (80,5-84,55)	77,4 (71,8-78,7)	0,001
МА (мм), 5 день	79,8 (77,55-81,55)	70,9 (67,5-73,2)	0,002
р	0,030	0,022	

Для исследования использовалась максимальная амплитуда тромбоэластограммы (МА, мм), время образования сгустка (R, мин) и сила упругости сгустка (G, дин/сек). Коагуляционная активность КТ, заготовленных на плазме, была ожидаемо выше, чем у КТ, заготовленных на добавочном растворе. Различия в R были статистически не значимыми, хотя R во II группе было короче по абсолютной величине, чем R в I группе, а величины G и МА были значимо выше у КТ, заготовленных на плазме.

В обеих группах при отсутствии существенного уменьшения числа тромбоцитов и изменения величины среднего объема наблюдалось значимое увеличение уровня активации по числу тромбоцитарных микрочастиц. При этом отмечена высокая метаболическая активность клеток, в частности гликолиза, что подтверждается значимым накоплением лактата. На фоне

значительного снижения агрегационного ответа на АДФ и коллаген сохранялся высокий уровень агрегационной активности на ристомицин, что свидетельствует о сохранности внешней клеточной оболочки. Следует отметить, что достаточно выраженная начальная степень активации тромбоцитов не повлияла ни на образование, ни на качество собственно сгустка в обеих группах, о чем свидетельствует значение максимальной амплитуды тромбоэластограммы к концу срока наблюдения. Очевидно, что при хранении как в добавочном растворе, так и в плазме тромбоциты по большей части утрачивают способность к внутриклеточной передаче сигнала активации. Различия в исходном и конечном уровнях агрегационной активности КТ в плазме и добавочном растворе могут быть вызваны снижением в SSP+ концентрации фибриногена и других факторов свертывания крови, влияющих на процесс агрегации тромбоцитов. Кроме того, может происходить механическая активация тромбоцитов в процессе их отмывки и ресуспензирования в новой среде, что приводит к опустошению их внутренних гранул хранения и, соответственно, к снижению реакции на добавление индуцирующего агента.

Результаты исследования подтверждают сохранность прокоагулянтной активности концентратов тромбоцитов, заготовленных как на плазме, так и на добавочном растворе SSP+, в течение 5 дней хранения.

Изучение статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от дополнительной обработки

К основным мероприятиям по обеспечению безопасности КТ относятся дополнительная обработка: лейкоредукция, облучение и патогенредукция, влияющие по результатам исследования на статус активации тромбоцитов [14].

Проведенные исследования по изучению статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от дополнительной обработки (лейкоредукция, облучение и патогенредукция) не выявили значимого влияния на образование тромбоцитарных микрочастиц. При сравнении методов лейкоредукции (фильтрации и LRS-камеры) существенных отличий по числу тромбоцитов и

содержанию ТМЧ выявлено не было. При этом содержание глюкозы было значимо ниже в концентратах тромбоцитов, заготовленных на аппарате Trima Accel, что связано с преобладанием в данной группе образцов КТ в добавочном растворе. Несмотря на полученные более низкие уровни показателей агрегационной и коагуляционной активности в группе КТ Trima Accel, достоверных данных получено не было. Анализ влияния облучения на параметры КТ выявил, что после облучения уровень тромбоцитарных микрочастиц в концентрате тромбоцитов повышается незначительно, при этом динамика метаболизма, агрегационная и коагуляционная активность до и после облучения не имели достоверных отличий. Исключение составило время образования сгустка, для которого получено значимое увеличение после процедуры облучения. Оценивая влияние патогенредукции, было обнаружено достоверное снижение количества тромбоцитов в КТ. Уровень тромбоцитарных микрочастиц в концентрате тромбоцитов после патогенредукции снижался незначительно и пропорционально снижению количества тромбоцитов. Показатели метаболизма также находились на одном уровне, однако было зафиксировано статистически значимое снижение рН. Патогенредукция также оказывала влияние на показатели агрегационной активности, что выражалось в снижении параметров агрегации с коллагеном и ристомицином. Несмотря на снижение показателей коагуляционной активности в КТ, статистически достоверных различий до и после патогенредукции не выявлено.

Проведённые исследования по изучению статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от дополнительной обработки показали отсутствие значимого влияния этих процедур на уровень тромбоцитарных микрочастиц.

Изучение статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от метода хранения: комнатная температура при постоянном помешивании, холодовой режим хранения

Исследования in vitro показали, что тромбоциты, хранящиеся при комнатной температуре, функционально и метаболически превосходят

тромбоциты, хранящиеся при 4°C. С другой стороны, ряд исследований доказывают, что хранившиеся при 4°C тромбоциты образуют более крепкий сгусток и снижают время кровотечения как у пациентов с тромбоцитопенией, так и у волонтеров, принимавших ацетилсалициловую кислоту [17, 18].

По таким показателям, как число тромбоцитов, клеточная морфология, состояние мембраны, цитоплазматическая структура, скорость агрегации, гемостатическая функция, тромбоциты, хранящиеся при 4 °C от 10 до 14 дней, превосходили тромбоциты, хранившиеся при 22°C в течение 5 дней [19, 20].

Сравнивали влияние температурных режимов хранения (тромбомиксер +22 ± 2°C - 1 группа) и медицинский холодильник (+4 ± 2°C - 2 группа) в день заготовки (1 день) и в конце срока хранения (5 день). Динамика содержания тромбоцитов, среднего объема и количества микрочастиц представлены в таблице 5.

Таблица 5

Динамика концентрации тромбоцитов, среднего объема тромбоцитов (MPV) и концентрации тромбоцитарных микрочастиц в зависимости от температурного режима хранения

Параметр/День	Me (Q ₁ – Q ₃), n=10		p
	1 группа	2 группа	
Тромбоциты (10 ⁹ /л), 1	1431 (1354-1542)	1434 (1311-1575)	0,880
Тромбоциты (10 ⁹ /л), 5	1370 (1229-1451)	898 (775-1032)	0,003
p	0,028	0,071	
MPV (фл), 1	8,20 (8,02-8,5)	8,15 (8,00-8,5)	0,818
MPV (фл), 5	8,60 (8,2-8,6)	9,00 (8,22-9,45)	0,940
p	0,202	0,072	
ТМЧ, 1	8912 (7137-17261)	11355 (6731-18165)	0,762
ТМЧ, 5	50819 (23051-69895)	28722 (10615-58553)	0,032
p	0,021	0,024	

Необходимо отметить значимое снижение количества тромбоцитов во время хранения в обеих группах (1 группа p=0,028, 2 группа p=0,071), при этом межгрупповые изменения характерны только на 5 день хранения (p=0,003).

Увеличение среднего объема имело место во 2 группе ($p=0,072$). Межгрупповые отличия отсутствовали. Средний объем тромбоцитов между группами существенно не отличался и находился в пределах референтных значений (средний объем тромбоцитов в норме варьирует от 7,4 до 10,54 фл). Вместе с тем необходимо отметить значимое нарастание этого показателя во 2 группе к концу эксперимента.

Количество микрочастиц значимо возрастало в обеих группах (1 группа $p=0,021$, 2 группа $p=0,024$). Межгрупповые отличия являлись значимыми к концу срока хранения. Прирост ТМЧ в 1 группе составил 570,2%, во 2 группе 252,9%.

Изменения рН и метаболизма представлены в таблице 6.

Таблица 6

Динамика показателей рН и метаболизма тромбоцитов в зависимости от температурного режима хранения

Параметр/День	Me ($Q_1 - Q_3$), n=10		p
	1 группа	2 группа	
рН, 1 день	7,028 (6,99-7,036)	7,020 (6,98-7,031)	0,623
рН, 5 день	6,968 (6,82-7,06)	7,036 (6,99-7,10)	0,104
p	0,203	0,386	
Глюкоза (ммоль/л), 1 день	17,6 (8,7-19,4)	17,3 (8,6-19,1)	0,571
Глюкоза (ммоль/л), 5 день	12,3 (5,87-15,7)	16,6 (7,62-18,4)	0,049
p	0,005	0,004	
Лактат (ммоль/л), 1 день	1,4 (0,87-2,4)	1,4 (0,8-2,4)	0,849
Лактат (ммоль/л), 5 день	10,9 (7,6-13,3)	4,8 (4,07-5,3)	0,003
p	0,004	0,005	

Изменения рН внутри групп были незначимыми. Межгрупповые различия отсутствовали. Концентрация глюкозы значимо уменьшалась в обеих группах (1 группа $p=0,005$, 2 группа $p=0,004$). Межгрупповые различия выявлены в конце срока наблюдения, причем более высокое содержание глюкозы выявлено во 2 группе ($p=0,049$). Содержание лактата ожидаемо

увеличивалось в обеих группах (1 группа $p=0,004$, 2 группа $p=0,005$). Межгрупповые различия показаны в конце эксперимента ($p=0,003$) с более высоким показателем в 1 группе.

При проведении агрегатометрии с целью исследования сохранности функциональной активности тромбоцитов были выбраны индукторы АДФ, коллаген и ристомин. Агрегационную активность КТ определяли по максимальной амплитуде агрегации (МА, %). Результаты показателей агрегационной активности представлены в таблице 7.

Таблица 7

Динамика агрегационной активности концентратов тромбоцитов в зависимости от режима хранения

Параметр/День	Me (Q1 – Q3), n=10		p
	1 группа	2 группа	
Агрегация с АДФ, МА (%), 1 день	28,5 (18,4-52,8)	32,4 (12,4-50,4)	0,917
Агрегация с АДФ, МА (%), 5 день	1,3 (0,8-4,1)	5,2 (4,1-10,5)	0,034
p	0,045	0,041	
Агрегация с коллагеном, МА (%), 1 день	61,8 (37,7-64,4)	56,8 (35,3-73,3)	0,917
Агрегация с коллагеном, МА (%), 5 день	1,8 (1,1-9,1)	26,2 (8,2-46,4)	0,028
p	0,022	0,034	
Агрегация с ристоминном, МА (%), 1 день	73,1 (39,2-80,7)	75,9 (39,8-81,8)	0,842
Агрегация с ристоминном, МА (%), 5 день	57,4 (13,3-74,9)	54,1 (46,4-74,1)	0,912
p	0,043	0,500	

Снижение агрегации с АДФ выявлено в обеих группах (1 группа $p=0,045$, 2 группа $p=0,041$). В конце срока наблюдения более низкий уровень агрегации выявлен в 1 группе ($p=0,034$). Очевидно, что при хранении в стандартных условиях тромбоциты утрачивают способность к внутриклеточной передаче сигнала активации в большей степени, чем при хранении в условиях гипотермии. В то же время различия в исходном и конечном уровнях агрегационной активности КТ при использовании разных температурных

режимов могут быть связаны с изменением уровней метаболической активности. Аналогичная динамика имела место и при использовании в качестве индуктора коллагена.

Исходные значения МА агрегации с коллагеном между группами не отличались ($p=0,917$). При хранении в течение 5 суток в обеих группах агрегационная активности при использовании коллагена значительно снижалась, причем более выражено в первой группе, что привело к значимым межгрупповым различиям ($p=0,028$) к концу срока наблюдения. При использовании в качестве индуктора ристомидина выявлено значимое снижение агрегационной активности к концу срока хранения в 1 группе ($p=0,043$). Во 2 группе значимого уменьшения агрегации с ристомидином не выявлено, что говорит о сохранности клеточной оболочки тромбоцитов ($p=0,50$). Межгрупповые отличия отсутствовали как в начале, так и в конце эксперимента.

Таким образом показано, что в процессе хранения агрегационные свойства тромбоцитов снижаются. Использование гипотермического режима хранения более выражено способствует сохранению агрегационных свойств тромбоцитов по сравнению с регламентированным способом хранения.

Для оценки прокоагулянтной активности КТ был применен метод тромбоэластографии. В исследовании использовались параметры максимальной амплитуды (МА, мм), время образования сгустка (R, мин) и сила упругости сгустка (G, дин/сек) (таблица 8).

Важно отметить значительное снижение прокоагулянтной активности в 1 группе, что выразилось в значимых изменениях всех исследованных параметров. Во второй группе имела место лишь тенденция к снижению определяемых показателей. Межгрупповые различия на сроках наблюдения отсутствовали за исключением удлинения R к концу срока наблюдения в 1 группе. Данные проведенного исследования по изучению статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от особенностей режима хранения выявили значимые различия в влиянии температуры как на степень

активации (по количеству микрочастиц), так и на метаболический статус, агрегационную способность и прокоагулянтную активность концентратов тромбоцитов. Результаты исследования вносят вклад в понимание биологических изменений в концентратах тромбоцитов при хранении в различных температурных условиях. Полученные данные диктуют необходимость дальнейшего изучения влияния гипотермии на свойства тромбоцитов и могут быть использованы для оптимизации протоколов заготовки, хранения и назначения трансфузий в клинической практике.

Таблица 8

Динамика показателей тромбоэластографии концентратов тромбоцитов в зависимости от режима хранения

Параметр/День	Me (Q1 – Q3), n=10		
	1 группа	2 группа	
ТЭГ 5000, R (мин), 1 день	7,9 (6,4-8,1)	7,2 (5,7-7,8)	0,245
ТЭГ 5000, R (мин), 5 день	9,8 (8,6-12,0)	6,5 (3,7-7,1)	0,009
p	0,041	0,588	
ТЭГ 5000, G (дин/сек), 1 день	22,0 (18,1-25,5)	20,1 (17,2-25,8)	0,834
ТЭГ 5000, G (дин/сек), 5 день	14,9 (11,9-19,0)	20,1 (16,5-22,8)	0,075
p	0,042	0,068	
ТЭГ 5000, МА (мм), 1 день	80,00 (77,4-83,6)	74,80 (70,4-79,2)	0,834
ТЭГ 5000, МА (мм), 5 день	70,44 (77,4-85,0)	72,10 (76,7-82,0)	0,075
p	0,048	0,080	

Заключение

Представленные данные позволяют более обоснованно подходить к выбору методов заготовки и обработки КТ. Результаты исследования вносят вклад в понимание биологических изменений в концентратах тромбоцитов под воздействием стандартных технологических процедур и могут быть использованы для оптимизации протоколов заготовки, хранения и назначения трансфузий в клинической практике.

Определение тромбоцитарных микрочастиц дает возможность оценить функциональные характеристики тромбоцитов, что позволяет оптимизировать как процесс заготовки и хранения концентратов тромбоцитов, так и его рациональное клиническое использование.

Управление запасами тромбоцитов, основанное на анализе содержания тромбоцитов и тромбоцитарных микрочастиц в концентратах тромбоцитов, является перспективной стратегией в области повышения эффективности и безопасности трансфузионной терапии.

Дальнейшее совершенствование технологий оценки качественных характеристик тромбоцитов с учетом статуса их активации будет способствовать повышению эффективности и безопасности трансфузионной терапии в медицинских организациях.

Список литературы

1. Ласточкина Д.В., Касьянов А.Д., Гришина Г.В. и др. Измерение тромбоцитарных микрочастиц в контексте оценки безопасности концентратов тромбоцитов. *Медлайн.ру*. 2024; 25: 352-63.
2. Maurer-Spurej E., Chipperfield K. Could Microparticles Be the Universal Quality Indicator for Platelet Viability and Function? *J. Blood Transfus.* 2016; 2016: 6140239. doi: 10.1155/2016/6140239.
3. Mittal K., Kaur R. Platelet storage lesion: an update. *Asian Journal of Transfusion Science.* 2015; 9(1): 1–3. doi: 10.4103/0973-6247.150933.
4. Pienimaeki-Roemer A., Kuhlmann K., Böttcher A. et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion.* 2015; 55(3): 507-21. doi: 10.1111/trf.12874.
5. Farrugia A., Vamvakas E. Toward a patient-based paradigm for blood transfusion. *Journal of Blood Medicine.* 2014; 5: 5–13. doi: 10.2147/JBM.S55769.
6. Касьянов А.Д., Г.В. Гришина, И.С. Голованова и др. Изучение статуса активации тромбоцитов в зависимости от используемой при заготовке аппаратуры. *Медлайн.ру*. 2025; 26(1): 25-38
7. Murphy S. Utility of in vitro tests in predicting the in vivo viability of stored PLTs. *Transfusion.* 2004; 44(4): 618–619. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.00355.x.

8. Apelseh T.O., Bruserud O., Wentzel-Larsen T., Hervig T. Therapeutic efficacy of platelet transfusion in patients with acute leukemia: an evaluation of methods. *Transfusion*. 2010; 50(4): 766-75. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02540.x.
9. Schiffer C.A., Anderson K.C., Bennett C.L. et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001; 19(5) :1519-38. doi: 10.1200/JCO.2001.19.5.1519.
10. Getz T.M., Montgomery R.K., Bynum J.A. et al. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016; 56(6) :1320-1328. doi: 10.1111/trf.13511.
11. Johnson L., Reade M.C., Hyland R.A. et al. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications. *Transfusion*. 2015; 55(4): 838-847. doi: 10.1111/trf.12915.
12. Johnson L., Tan S., Wood B. et al. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*. 2016; 56(7): 1807-1818. doi: 10.1111/trf.13630.
13. Гришина Г.В., Касьянов А.Д., Кробинец И.И. и др. Микрочастицы – потенциальный маркер оценки качества концентрата тромбоцитов. *Медлайн.ру*. 2024; 25(2): 542-65.
14. Смирнова О.А., Матвиенко О.Ю., Голованова И.С. и др. Характеристика тромбоцитарных микрочастиц у первичных и регулярных доноров тромбоцитов. *Трансфузиология*. 2025; 26 (3): 238 -43.
15. Cattaneo M., Cerletti C., Harrison P. et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013; 11: 1183-89.
16. Ройтман Е.В., Колесникова И.М., Карпова О.В. и др. Изменения гемостатических свойств сгустка при хранении тромбоцитарных концентратов, заготовленных разными методами. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59 (3): 30-34.

17. Sandgren P., Mayaudon V., Payrat J.M. et al. 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. *Vox Sang.* 2010; 98(3 Pt 2): 415-422. doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01255.x.
18. Reddoch K.M., Pidcock H.F., Montgomery R.K. et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock.* 2014; 41 Suppl 1(01):54-61. doi: 10.1097/SHK.0000000000000082.
19. Pidcock H.F., Cap A.P. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards: reply. *Shock.* 2015; 43(3): 298-299. doi: 10.1097/SHK.0000000000000300.
20. Bynum J.A., Meledeo M.A., Getz T.M. et al. Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability. *Transfusion.* – 2016. – Vol. 56, Suppl. S1. – P. S76-S84.

References

1. Lastochkina D.V., Kas`yanov A.D., Grishina G.V. i dr. Izmerenie trombocitarny`x mikrochasticz v kontekste ocenki bezopasnosti koncentratov trombocitov. *Medline.ru.* 2024; 25: 352-6.
2. Maurer-Spurej E., Chipperfield K. Could Microparticles Be the Universal Quality Indicator for Platelet Viability and Function? *J. Blood Transfus.* 2016; 2016: 6140239. doi: 10.1155/2016/6140239.
3. Mittal K., Kaur R. Platelet storage lesion: an update. *Asian Journal of Transfusion Science.* 2015; 9(1): 1–3. doi: 10.4103/0973-6247.150933.
4. Pienimaeki-Roemer A., Kuhlmann K., Böttcher A. et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. *Transfusion.* 2015; 55(3): 507-21. doi: 10.1111/trf.12874.
5. Farrugia A., Vamvakas E. Toward a patient-based paradigm for blood transfusion. *Journal of Blood Medicine.* 2014; 5: 5–13. doi: 10.2147/JBM.S55769.

6. Kas`yanov A.D., G.V. Grishina, I.S. Golovanova i dr. Izuchenie statusa aktivacii trombocitov v zavisimosti ot ispol`zuemoj pri zagotovke apparatury`. Medline.ru. 2025; 26(1): 25-38.
7. Murphy S. Utility of in vitro tests in predicting the in vivo viability of stored PLTs. *Transfusion*. 2004; 44(4): 618–619. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.00355.x.
8. Apelseh T.O., Bruserud O., Wentzel-Larsen T., Hervig T. Therapeutic efficacy of platelet transfusion in patients with acute leukemia: an evaluation of methods. *Transfusion*. 2010; 50(4): 766-75. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02540.x.
9. Schiffer C.A., Anderson K.C., Bennett C.L. et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001; 19(5) :1519-38. doi: 10.1200/JCO.2001.19.5.1519.
10. Getz T.M., Montgomery R.K., Bynum J.A. et al. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016; 56(6) :1320-1328. doi: 10.1111/trf.13511.
11. Johnson L., Reade M.C., Hyland R.A. et al. In vitro comparison of cryopreserved and liquid platelets: potential clinical implications. *Transfusion*. 2015; 55(4): 838-847. doi: 10.1111/trf.12915.
12. Johnson L., Tan S., Wood B. et al. Refrigeration and cryopreservation of platelets differentially affect platelet metabolism and function: a comparison with conventional platelet storage conditions. *Transfusion*. 2016; 56(7): 1807-1818. doi: 10.1111/trf.13630.
13. Grishina G.V., Kas`yanov A.D., Krobinecz I.I. i dr. Mikrochasticy – potencial`ny`j marker ocenki kachestva koncentrata trombocitov. *Medline.ru*. 2024; 25(2): 542-65.
14. Smirnova O.A., Matvienko O.Yu., Golovanova I.S. i dr. Xarakteristika trombocitarny`x mikrochasticz u pervichny`x i reguljarny`x donorov trombocitov. *Transfuziologiya*. 2025; 26 (3): 238 -43.
15. Cattaneo M., Cerletti C., Harrison P. et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013; 11: 1183-89.

16. Rojzman E.V., Kolesnikova I.M., Karpova O.V. i dr. Izmeneniya gemostaticeskix svojstv sgustka pri xranenii trombocitarny`x koncentratov, zagotovlenny`x razny`mi metodami. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2014; 59 (3): 30-34.
17. Sandgren P., Mayaudon V., Payrat J.M. et al. 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. *Vox Sang*. 2010; 98(3 Pt 2): 415-422. doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01255.x.
18. Reddoch K.M., Pidcock H.F., Montgomery R.K. et al. Hemostatic function of apheresis platelets stored at 4°C and 22°C. *Shock*. 2014; 41 Suppl 1(01) :54-61. doi: 10.1097/SHK.0000000000000082.
19. Pidcock H.F., Cap A.P. Refrigerated platelets for the treatment of acute bleeding: a review of the literature and reexamination of current standards: reply. *Shock*. 2015; 43(3): 298-299. doi: 10.1097/SHK.0000000000000300.
20. Bynum J.A., Meledeo M.A., Getz T.M. et al. Bioenergetic profiling of platelet mitochondria during storage: 4°C storage extends platelet mitochondrial function and viability. *Transfusion*. – 2016. – Vol. 56, Suppl. S1. – P. S76-S84.