

УДК 615.38.356.33.005.007

Организационные аспекты применения низкотемпературных технологий в современной производственной трансфузиологии

Д-р мед. наук, проф., академик МАХ А.В. ЧЕЧЕТКИН, канд. мед. наук В.Н. ВИЛЬЯНИНОВ, канд. мед. наук С.П. КАЛЕКО,

д-р биол. наук, академик МАХ Ш.М. БАГАУТДИНОВ, Г.И. ПЕТРЕНКО

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург

Necessity of creating of long-term reserves of blood components, conserved by various cryogenic methods is proved. Current methods of cryoconservation are considered. The tasks of divisions of cryoconservation are stated, necessary equipment, facilities and number of staff are considered. It is indicated that in Russia the creation of cryoconservation facilities is constrained due to absence of modern domestic equipment and cryoprotectors.

Введение

Проблемы криоконсервирования замораживанием и долгосрочного хранения клеток крови, костного мозга и других тканей исключительно актуальны для практической медицины. Многочисленные попытки разработать эффективные способы долгосрочного хранения компонентов крови при положительных температурах не дали существенных результатов. В настоящее время положение о том, что многолетнее хранение клеток крови возможно лишь при обеспечении полного прекращения внутриклеточных обменных процессов, т. е. в состоянии глубокого анабиоза, является общепризнанным [1].

Основой разработки методов криоконсервирования клеток крови и костного мозга для долгосрочного хранения послужили исследования особенностей их холодовой резистентности, режимов замораживания и отогрева, действия криопротекторов, а также успехи в области создания специальной аппаратуры для замораживания и хранения клеток при низких температурах [3].

Начало экспериментальной деятельности по разработке способов замораживания клеток крови с целью их консервирования относится к 1940 – 1960 гг. В эти годы были проведены эксперименты по замораживанию эритроцитов при различных температурах (в том числе и при -196°C в жидком азоте) под защитой растворов глюкозы разной концентрации. Эти исследования выявили значение таких параметров, как скорость охлаждения-оттаивания, концентрация ограждающего раствора и постоянство температуры хранения [4, 5].

Основоположником широкого внедрения криоконсервирования в трансфузиологическую практику стал P.L.Mollison, под руководством которого был разработан способ криоконсервирования эритроцитов под за-

щитой глицерина и издано первое «Руководство по переливанию крови». Значительными вехами в становлении криоконсервирования клеток крови как науки стали работы, выполненные отечественными исследователями в 1950 – 1965 гг. Специалистами Ленинградского НИИ гематологии и переливания крови в 1952 – 1954 гг. был разработан метод консервирования крови в переохлажденном состоянии при температурах $-16\ldots-12^{\circ}\text{C}$ с применением этилового спирта и желатина, что позволило увеличить срок хранения консервированной крови до 70 дней.

Открытие криопротективных свойств некоторых веществ, ограждающих клетки от криоповреждения при замораживании, так же как и возможность ультрабыстрого охлаждения крови, явились основой для развития двух направлений в разработке проблемы консервирования крови при низких температурах: быстрого охлаждения при ультразвуковых температурах ($-196\ldots-150^{\circ}\text{C}$) и медленного замораживания эритроцитов при температурах от -80 до -30°C .

За рубежом большее распространение получили способы замораживания и длительного хранения эритроцитов при умеренно низких температурах ($-80\ldots-20^{\circ}\text{C}$) в электрорефрижераторах под защитой 40 – 50%-ного глицерина. Лечебная эффективность таких эритроцитов была апробирована в рамках медицинского обеспечения военных действий США во Вьетнаме, когда под руководством C.R.Valeri раненым с острой кровопотерей производились гемотрансфузии эритроцитов O(I) группы резус-отрицательной принадлежности, замороженных при -80°C [2, 9, 10].

В настоящее время крупные зарубежные банки крови в системе Красного Креста сочетают в своей рабо-

те способы длительного хранения клеточных суспензий при ультра- и умеренно низких температурах [8].

В последнее время за рубежом проявляется интерес к изучению криозащитных свойств гидроксиэтилкрахмала (ГЭК), который впервые в клинической практике был использован в качестве плазмозаменителя. Несомненным преимуществом данного вещества является то, что оно относится к числу экстракеллюлярных криопротекторов и является эффективным при криоконсервировании эритроцитов и некоторых других клеток крови. Для замораживания эритроцитов под защитой ГЭК обычно применяют быстрое замораживание до -196°C и быстрый отогрев при температуре 48°C . Результаты исследований показали, что при глубоком замораживании эритроцитов с ГЭК 14–15%-ная концентрация является оптимальной для проявления максимального защитного эффекта [7]. Использование ГЭК в качестве криопротектора для создания запасов криоконсервированных эритроцитов является перспективным направлением программы НАТО по совершенствованию медицинского обеспечения вооруженных сил в современных условиях.

В нашей стране наибольшее распространение получил метод криоконсервирования эритроцитов, быстро замороженных при ультразарубинных температурах в жидким азоте с ограждающим раствором, содержащим 15–20%-ный глицерин в рабочей концентрации (растворы ЦНИИКПК 11₄, ЦНИИГПК 11₅). В последние годы начались поиски в области использования умеренно низких ($-80\ldots-20^{\circ}\text{C}$) температур для долгосрочного хранения компонентов крови и костного мозга [6].

Прогресс в деятельности службы крови теснейшим образом связан с развитием деятельности банка крови, оснащенного криогенным оборудованием, позволяющим использовать диапазон как умеренно низких, так и сверхнизких температур.

Лечебная ценность применения криоконсервированных компонентов крови доказана многочисленными клиническими наблюдениями. Следует особо акцентировать внимание на тех преимуществах, которые имеют декриоконсервированные и отмытые эритроциты перед эритроцитами, хранившимися при положительных температурах.

❖ Криоконсервированные эритроциты и тромбоциты, длительно хранившиеся в условиях холодового анабиоза, мало отличаются по своим морфофункциональным показателям от свежезаготовленных клеток.

❖ Взвесь размороженных и отмытых эритроцитов практически не содержит лимоннокислого натрия, в ней

снижено содержание калия и метаболитов, накапливающихся в процессе хранения консервированной крови при положительной температуре.

❖ Возможность длительного хранения позволяет создать достаточные запасы эритроцитов редких групп крови.

❖ Криоконсервирование позволяет успешно решать проблему заблаговременного накопления аутогемоцитов для больных, которым предстоит травматичное оперативное вмешательство с прогнозируемой значительной кровопотерей.

❖ Однократные и повторные трансфузии реабилитированных после низкотемпературного консервирования эритроцитов, как правило, не сопровождаются посттрансфузионными реакциями благодаря тому, что при отмывании удаляются лейкоциты, тромбоциты и белковые компоненты плазмы, к которым реципиенты нередко бывают сенсибилизированы, особенно после предшествующих многократных переливаний крови.

❖ Трансфузии размороженных отмытых эритроцитов снижают риск заражения реципиента вирусным гепатитом.

Декриоконсервированные эритроциты могут применяться как в экстренных ситуациях, например в медицине катастроф, так и в плановой хирургии.

Учитывая сложность технологического процесса декриоконсервации и высокую стоимость декриоконсервированных и отмытых эритроцитов, их применяют в комплексном лечении пациентов с тяжелой формой гемической гипоксии:

- при массивной кровопотере, сопровождающейся риском развития синдрома гомологичной крови;
- при лечении гемотрансфузионных осложнений, возникших в результате переливания иногруппной крови;
- при тяжелой патологии печени и почек, в частности при острой почечной и печеночной недостаточности;
- для лечения анемии аутоиммунного характера;
- при аллосенсибилизации к антигенам клеток крови, белкам плазмы и склонности к аллергическим реакциям и осложнениям;
- при хронических анемических состояниях различного происхождения, в том числе при гнойно-септических заболеваниях;
- при анемии у лиц с врожденным дефицитом IgA, для предотвращения анафилактической реакции на минимальные дозы данного иммуноглобулина.

Таким образом, все вышесказанное наглядно иллюстрирует актуальность проблемы создания достаточных запасов эритроцитов, тромбоцитов и миелокариоцитов, криоконсервированных различными методами. Вместе с тем способы сохранения биоматериала при уме-

Способы хранения в замороженном состоянии компонентов крови и костного мозга

Методы консервирования	Температура хранения, °C	Компонент	Тип контейнеров	Криопротектор	Срок хранения
Замораживание при умеренно низких температурах	-40...-25	Эритроциты	Первичный*	Глицерин, 20 %	6 – 12 мес
	-30		Стеклянный, первичный*	Глицерин, 33 – 34 %	1 год
	-40		Стеклянный	Глицерин, 39,6 %	2 года
	-60..-40		Стеклянный	ДМСО, 15 % + ПВП, 10 %	2 года
	-65		Первичный*	Глицерин, 40 %	3 года
	-70..-60		Первичный*	Пропиленгликоль, 17,5 % + ДМАЦ, 5 %	4 года
	-80		Первичный*	ДМАЦ, 2,5 %	5 лет
	-80		Тромбоциты	–	3 года
	-20		Плазма	–	6 мес
	-30 и ниже			–	12 мес
Криоконсервирование при ультранизких температурах	-196..-130	Эритроциты	Специальный**	Глицерин, 20 %	10 лет
	-196	Тромбоциты		Пропиленгликоль, 17,5 %	10 лет
		ДМАЦ, 2,5 %		7 лет	
		Миелокариоциты		ДМАЦ, 3 %	5 – 10 лет

Примечания: * – стандартный контейнер (ПВХ), в который кровь заготовлена от донора; ** – металлический контейнер или контейнер из специализированного пластика; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМАЦ – диметилацетамид.

ренно низких температурах в полимерных контейнерах с использованием электрорефрижераторной аппаратуры в России не получили должного развития, в то время как именно такой диапазон используемых температур позволяет создать мобильные запасы гемокомпонентов, наиболее применяемых в экстренных ситуациях. Особенно остро встает вопрос о необходимости одномоментного использования большого количества ГТС в медицине катастроф при возникновении очагов массовых санитарных потерь вследствие техногенных причин (Чернобыль, Уфа), природных явлений (Армения, Сахалин), социальных факторов (локальные войны и вооруженные конфликты). В каждой из таких ситуаций перед военно-медицинской службой ставится задача срочного проведения лечебно-эвакуационных мероприятий. Следовательно, экстренное решение вопросов трансфузиологического обеспечения лиц с острой массивной кровопотерей, ожогами, лучевыми поражениями и т.д. может быть эффективным при условии заблаговременного резервирования соответствующих средств.

Материалы и методы

С целью создания стратегических запасов гемокомпонентов на случай возникновения чрезвычайной ситуации, сопровождающейся одновременным появлением значительного количества пострадавших, нуждающихся в проведении гемотрансфузионной терапии (ГТТ), в учреждениях службы крови ВС РФ (НИО крови и тканей НИЦ ВМедА, ГВКГ им. Бурденко, ЦВГ им. Вишневского, окружных госпиталях ЛенВО, ДВО и др.) были созданы банки низкотемпературного консервирования компонентов крови и костного мозга. Внедрение методов долгосрочного хранения крови и ее компонентов, а также костного мозга в практику значительно расширило возможности службы крови по их оптимальному использованию, более полной реализации современных принципов гемокомпонентной терапии, а также по созданию мобильных запасов ГТС.

В современных условиях термин «банк крови» означает наличие специализированного отделения криоконсервирования и долгосрочного хранения компонентов крови и костного мозга в составе службы переливания

крови (СПК) или госпитального отделения переливания крови, оснащенного криогенной аппаратурой, позволяющей использовать диапазон умеренно низких ($-80\dots-20$ °C), низких ($-140\dots-90$ °C) и сверхнизких ($-196\dots-150$ °C) температур. В таблице представлены способы низкотемпературного консервирования клеток крови, в той или иной степени используемые в учреждениях службы крови РФ.

Персонал банка крови работает в тесном взаимодействии с другими структурными подразделениями СПК: отделениями заготовки, переработки, лабораторного обследования крови и др.

На отделение криоконсервирования возложены следующие задачи:

❖ Создание запаса донорских эритроцитов, большей частью редких групп, для бесперебойного обеспечения клиник, особенно в период отсутствия доноров, а также на особый период.

❖ Обеспечение широкого использования криоконсервированных аутогенных эритроцитов, тромбоцитов, плазмы в плановой хирургии (сердечно-сосудистая, торакальная, абдоминальная хирургия, ортопедия, гинекология, урология и др.).

❖ Создание запаса криоконсервированных тромбоцитов, типированных по HLA, на случай экстренного их использования при тромбоцитопеническом кровотечении или его угрозе у больных онкогематологического профиля.

❖ Обеспечение трансплантации костного мозга или стволовых клеток.

❖ Криоконсервирование аутологичного костного мозга гематологических и онкологических больных с целью их последующих аутотрансплантаций.

❖ Создание банка аутологичного костного мозга здоровых лиц, по роду профессиональной деятельности связанных с повышенной опасностью радиационного поражения.

❖ Создание запасов донорского костного мозга, типированного по системе HLA.

❖ Создание банка клеток крови для лабораторных исследований (стандартные эритроциты, лимфоциты и т.д.).

❖ Накопление запасов карантинизированной свежезамороженной плазмы, в том числе иммунной.

Для решения указанных задач в типовом варианте предусмотрен штат отделения криоконсервирования клеток крови и костного мозга, состоящий из 7 человек:

- Заведующий отделением

(врач-трансфузиолог)

1

• Инженер	1
• Техник	1
• Санитар	1

Разворачивание отделения криоконсервирования на базе СПК подразумевает выделение 90...120 м² площади для размещения:

• операционной для подготовки клеток крови и костного мозга к низкотемпературному консервированию и предтрансфузионной реабилитации криоконсервированных компонентов крови;

• центрифужной;

• собственно низкотемпературного хранилища, представляющего собой комплект криогенного оборудования (жидкоазотные камеры, электрорефрижераторные прилавки-холодильники), программных замораживателей, оборудования для размораживания криоконсервированных компонентов крови, вспомогательного оборудования и аппаратуры;

• участка для подготовки материала и мытья контейнеров;

• комнаты для личного состава.

Все рабочие места должны соответствовать нормам СНИП.

Для оснащения банка крови необходимо иметь также специальное оборудование.

Оборудование	Количество, шт.
Емкость для доставки и хранения жидкого азота ЦТК 2,5/0,25	1
Хранилища биопродуктов ХБ-0,5	8
Хранилища биопродуктов ХБ-0,2	2
Сосуд Дьюара для переноса биопродуктов на 5 л	3
Сосуд Дьюара для переноса биопродуктов на 9 л	3
Программный замораживатель биопродуктов	1
Морозильная камера на $-40\dots-25$ °C	2
Морозильная камера на -80 °C емкостью не менее 400 л	2
Морозильная камера на -140 °C	2
Холодильник медицинский на $+4$ °C емкостью не менее 80 л	2
Рефрижераторная центрифуга со стаканами не менее 1 л	2
Контейнеры для хранения образцов емкостью, мл:	
270	2000
160	600
75	400

- Врач-хирург

- Операционная медицинская сестра

2

Функционирование банка крови подразумевает налаживание бесперебойного поступления из аптеки криоконсервантов на основе современных криопротекторов (глицерин, диметилацетамид, пропиленгликоль, диметилсульфоксид), отмывающих (растворы хлорида натрия или маннита различных концентраций) и взвешивающих (раствор на основе сахарозы) растворов.

Несмотря на то, что существует достаточно много методов низкотемпературного консервирования эритроцитов, для всех них характерна одинаковая последовательность этапов работы, в которой можно выделить следующее:

- подготовка клеток крови к замораживанию (добавление криозащитных растворов, экспозиция клеток с криопротектором при плюсовой температуре);
- непосредственно замораживание, проводимое по соответствующим программам в специальных аппаратах;
- хранение замороженных биообъектов в электрохолодильниках или в биохранилищах с жидким азотом, а также при возникновении необходимости транспортировки их потребителям;
- отогрев (размораживание);
- удаление криопротектора и отмывание клеток.

При выполнении всех этапов криоконсервирования важнейшее значение имеет надлежащее техническое оснащение, которое рассматривалось выше.

При криоконсервировании клеток крови и костного мозга нами применяются следующие способы:

▽ Метод ЦНИИГПК. Замораживание эритроцитов в жидким азоте до $-196\ldots-150$ °C в алюминиевых гемоконтейнерах под защитой раствора ЦНИИГПК 11₅ с 15%-ной рабочей концентрацией глицерина.

▽ Криоконсервирование эритроцитов при температуре $-196\ldots-150$ °C в жидким азоте под защитой консерванта «Пропандиосахароль» с конечной концентрацией пропиленгликоля 18,5% с использованием металлических контейнеров в качестве резервуара для замораживаемых биосуспензий.

▽ Криоконсервирование тромбоцитов при температуре -196 °C в гемоконтейнерах с использованием в качестве криопротектора раствора «Тромбокриодмац» с конечной концентрацией диметилацетамида (ДМАЦ) 2,5 %.

▽ Замораживание костного мозга при температуре -196 °C в жидким азоте в металлических гемоконтейнерах под защитой 10%-ного диметилсульфоксида (ДМСО) или 3%-ного ДМАЦ.

▽ Хранение свежезамороженной и замороженной плазмы при температуре -40 и -80 °C в электрохолодильниках в полихлорвиниловых контейнерах типа «Компогласт».

Вышесказанное наглядно демонстрирует преоблада-

ние в практической деятельности отделения криоконсервирования клеток крови и костного мозга методов их хранения при ультранизких температурах с использованием жидкого азотного оборудования, несмотря на ряд преимуществ электрорефрижераторного метода перед жидкого азотным, а именно:

▽ Замораживание клеточных супензий в электрорефрижераторе позволяет отказаться от громоздкого и дорогостоящего жидкого азотного оборудования. Особенно выгоден этот метод там, где жидкого азота нет, он дефицитен или требует для доставки длительной транспортировки.

▽ Отпадает необходимость в использовании специальных металлических контейнеров, так как замораживание, хранение и отмывание производятся в стандартных пластиковых контейнерах, в которые кровь была первоначально заготовлена.

▽ Возможна транспортировка эритроцитов в замороженном состоянии в изотермическом ящике с использованием сухого льда.

▽ Кратковременные колебания температуры, например, при технических неполадках в рефрижераторах не являются фатально губительными для клеточного материала, как при хранении в жидком азоте.

Все это побудило нас активно вести поиск альтернативных путей криоконсервирования гемокомпонентов.

Результаты и их обсуждение

В последние годы в НИО крови и тканей НИЦ ВМедА разработаны способы замораживания эритроцитов и тромбоцитов при умеренно низких температурах в электрорефрижераторах с использованием полимерных гемоконтейнеров отечественного производства типа «Гемакон» и «Компопласт».

Метод низкотемпературного консервирования эритроцитов при температуре -80 °C под защитой криоконсерванта, содержащего пропиленгликоль и ДМАЦ в конечных концентрациях 18,5 и 5 % соответственно обеспечивает сохранность до 94 ± 3 % клеток. Суть метода: эритроцитный концентрат, полученный из 400 мл крови, насыщается раствором криопротектора, тщательно перемешивается и распределяется в обоих отделениях «Гемакона 500/300» (800 мл). «Гемакон» помещается в металлический пенал-холдер. Затем эритроциты охлаждаются со скоростью 4 °C/мин до -80 °C. После этого замороженный эритроцитоконцентрат переносится в низкотемпературный прилавок (-80 °C) для длительного хранения. В результате исследований, выполненных после размораживания, отмывания и ресусцирования эритроцитов до гематокрита $41,8 \pm 0,28$ г, были получены следующие результаты: содержание

общего гемоглобина составляло $47,1 \pm 0,80$ г, уровень свободного гемоглобина не превышал $0,69 \pm 0,04$ г/л, показатели кислотной резистентности свидетельствовали о преобладании в исследуемых пробах высоко- и среднестойких ($90,9 \pm 0,70$ %) эритроцитов. Количество сфероцитов было не более $2,4 \pm 0,39$ %. Индекс деформируемости эритроцитов составлял $0,98 \pm 0,04$ у. е., коэффициент вязкости среды не превышал $2,08 \pm 0,05$ у.е. Такой показатель морфофункциональной полноценности эритроцитов как интенсивность реакции ПОЛ был достоверно лучше в опытных группах, чем в контроле (эритроциты, криоконсервированные в жидким азоте под защитой «Пропандиосахароля»). Показатели, характеризующие степень сохранности газотранспортной функции декриоконсервированных эритроцитов, были достоверно лучше у клеток, подвергавшихся низкотемпературному хранению при -80 °С: Р₅₀ у эритроцитов, замораживавшихся до -80 °С, составил $23,0 \pm 0,38$ мм рт. ст., а в контроле (-196 °С) $- 21,2 \pm 0,44$ мм рт. ст.; коэффициент Бора соответственно равнялся $0,31 \pm 0,003$ у. е. и $0,30 \pm 0,002$ у. е.; уровень внутриклеточного АТФ для клеток опытной и контрольной групп исследования был соответственно $3,33 \pm 0,05$ мкмоль/г Нb и $3,15 \pm 0,05$ мкмоль/г Нb. Длительность хранения эритроцитов при температуре -80 °С составляла 2 года (срок наблюдения). Таким образом, эритроциты, замороженные разработанным методом, по своим функциональным показателям являются полноценной трансфузционной средой.

Способ замораживания тромбоцитов (КТ) до -80 °С в электрохолодильнике под защитой 2,5%-ного ДМАЦ. Суть метода: пенал-холдер с подготовленными к замораживанию тромбоцитами помещают в электрорефрижераторный прилавок с температурой -80 °С, где происходит охлаждение биосуспензии со скоростью 2...3 °С/мин. Хранение концентрата тромбоцитов осуществляется в том же электрохолодильнике при температуре -80 °С.

Сроки хранения концентратов тромбоцитов при температуре -80 °С составляли от 6 до 18 мес.

Эффективность низкотемпературного консервирования тромбоцитов в электрохолодильнике при -80 °С сравнивали с показателями эффективности общепринятого метода криоконсервирования тромбоцитов в жидким азоте при температуре -196 °С (контрольная группа).

Сохранность клеток в концентратах тромбоцитов, замороженных в полимерном контейнере в электрохолодильнике, оказалась более чем на 10 % выше, чем в КТ, криоконсервированных в алюминиевых контейнерах в жидким азоте ($70,23 \pm 2,44$ % и $59,3 \pm 1,7$ % соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют также о более высокой сохранности функциональных свойств клеток в тромбоцитоконцентратах, консервированных при температуре -80 °С.

Выводы

✓ Применение в учреждениях и подразделениях службы крови низкотемпературных технологий консервирования и длительного хранения клеток крови и костного мозга способствует улучшению обеспечения гемотрансfusionными средствами раненых, пострадавших и больных.

✓ При организации «банков» долгосрочного хранения гемокомпонентов целесообразно использовать наряду с жидким азотом оборудованием (-196 °С) и электрохолодильники с температурой $-70\dots-80$ °С и ниже.

✓ Создание системы «банков» крови имеет общегосударственное значение, поскольку целесообразность развития и использования сети низкотемпературных хранилищ в службе крови РФ как в мирное время, так и в чрезвычайных ситуациях является неоспоримой. Решение проблемы на сегодняшний день сдерживается нехваткой современного отечественного оборудования: программных замораживателей, низкотемпературных холодильников, полимерных контейнеров для хранения биопродуктов и т.п., а также отсутствием в достаточном количестве и ассортименте эффективных отечественных экстра- и интрацеллюлярных криопротекторов.

Список литературы

1. Аграненко В.А., Федорова Л.И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. – М., 1983.
2. Валери С.Р. Последние достижения в консервировании человеческих эритроцитов при помощи методов замораживания с глицерином // Вопросы консервирования эритроцитов методом замораживания: Сб. реф. зарубежных публикаций. – М., 197. Т. 2.
3. Криоконсервирование клеточных супензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. – Киев, 1983.
4. Пушкиарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. – Киев, 1975.
5. Р.е Луи. Консервация жидким холодом. – М., 1962.
6. Руководство по военной трансфузиологии / Под ред. Э.А. Нечаева – М., 1991.
7. Sputtek A., Singbartl G., Schleinzer W. Cryo-preservation of human red blood cells (RBC) using hydroxyethyl starch (HES) and liquid nitrogen: autologous retransfusion in healthy volunteers // Abstracts of XXII Congress ISBT. – Amsterdam. 1994. № 0165.
8. Valeri C.R. An integrated Liquid-Frozen Blood Banking System // Vox. Sang. 1983. Vol. 45, № 1.
9. Valeri C.R. Use of frozen blood in Vietnam // Proc. XI Congress ISBT. – Sydney. 1966. № 0107.
10. Valeri C.R., Valeri D. Red Blood Cell concentration stored at 4°C for 35 days in CPDA-1, CPDA-2 or CPDA-3 anticoagulant preservative, biochemically modified, and frozen and stored in the polyvinylchloride plastic primary collection bag with 40 % w/v glycerol at -80 °C // Transfusion. 1982. Vol. 22, № 4.