

КОАГУЛОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Лемонджавя В.Н.¹, Сидоркевич С.В.², Касьянов А.Д.²

ОДНОСТАДИЙНЫЙ КЛОТТИНГОВЫЙ МЕТОД ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФАКТОРА VIII В ОЦЕНКЕ СОХРАННОСТИ ДОНОРСКОЙ СВЕЖЕЗАМОРОЖЕННОЙ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПОСЛЕ ОТТАИВАНИЯ

¹ ООО "Научно-производственная организация "БИОМЕДТЕХ", 124482, Москва, Россия;

² ФГБУ "Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России", 191024, Санкт-Петербург, Россия

Изменение активности фактора VIII под влиянием различных воздействий на донорскую плазму крови неоднократно становилось предметом сравнительных исследований. Иногда суммарная погрешность измерений может иметь большее влияние на сравниваемые выборки, чем эффект от применяемых воздействий. Целью работы являлась оценка применимости одностадийного клоттингового метода в исследовании влияния термических и механических воздействий при размораживании человеческой плазмы крови на сохранность ее показателей. Для этого донорскую плазму разделили на парные образцы, которые замораживали, а затем нагревали от -30 °C до +36,6 °C. Каждый первый парный образец подвергался стандартным воздействиям в серийно выпускаемом устройстве для размораживания, а второй - одному из четырех высокоинтенсивных режимов нагревания. Определение активности фактора VIII осуществлялось до и после оттаивания путем двукратных повторных измерений на автоматическом коагулометре ACL TOP 300 с использованием реагентов HemosIL. Активность фактора VIII в образцах после высокоинтенсивного оттаивания была выше, чем после стандартной процедуры. Разница в процентном отношении к средним исходным значениям составляла от 2,1 до 7,3 %. При повторных измерениях превышение фактической внутрисерийной вариации результатов над ожидаемой по описанию реагента было надежным маркером для выявления аномальных значений. Представлены примеры их влияния на результаты сравнительного исследования и описан подход к организации лабораторной службы для предупреждения ошибок. Показана на ограниченной выборке применимость одностадийного клоттингового метода измерения активности фактора VIII в исследовании влияния высокоинтенсивных режимов оттаивания на сохранность плазмы крови.

Ключевые слова: активность фактора VIII; плазма крови; оттаивание

Для цитирования: Лемонджавя В.Н., Сидоркевич С.В., Касьянов А.Д. Одностадийный клоттинговый метод измерения активности фактора VIII в оценке сохранности донорской свежзамороженной плазмы крови после оттаивания. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (7): 324-331. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-324-331>

Для корреспонденции: Лемонджавя Вахтанг Нодарович, ст. науч. сотр. отдела исследований и разработок медицинской техники научно-производственной организации "БИОМЕДТЕХ"; e-mail: lemonjava.vahtang@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-29-00385, <https://rscf.ru/project/23-29-00385/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.04.2024
Принята к печати 22.05.2024
Опубликовано 25.06.2024

Lemondzhava V.N.¹, Sidorkevich S.V.², Kasyanov A.D.²

A ONE-STAGE CLOTTING ASSAY FOR MEASURING FACTOR VIII ACTIVITY IN ASSESSING THE SAFETY OF DONOR FRESH FROZEN BLOOD PLASMA AFTER THAWING

¹ LLC "Scientific and Production Organization "BIOMEDTECH", 124482, Moscow, Russia;

² Federal State Budgetary Institution "Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology of the Federal Medical and Biological Agency of Russia", 191024, St. Petersburg, Russia

Comparative studies have repeatedly examined the changes in factor VIII activity in donor blood plasma under various influences. The total measurement error may sometimes have a greater impact on the compared samples than the applied exposures. The aim of this study was to evaluate the suitability of the one-stage clotting assay for investigating the influence of thermal and mechanical effects on the preservation of human blood plasma parameters during thawing. To accomplish this, the donor plasma was divided into paired samples, frozen, and then heated from -30 °C to +36.6 °C. Each first paired sample underwent standard exposures in a commercially available thawing device, while the second underwent one of four high-intensity heating modes. Factor VIII activity was determined before and after thawing by twice repeated measurements on an automatic coagulometer ACL TOP 300 using HemosIL reagents. The activity of factor VIII in samples after high-intensity thawing was higher than after the standard procedure. The difference, expressed

as a percentage of the mean initial values, ranged from 2.1% to 7.3%. In repeated measurements, the excess of the actual within-series variation in results over that expected from the reagent description was a reliable marker for detecting anomalous values. This text presents examples of how anomalous values can influence the results of a comparative study and describes an approach to organizing a laboratory service to prevent errors. The applicability of the one-stage coagulation assay for the measurement of factor VIII activity to study the effect of high-intensity thawing modes on the preservation of blood plasma was demonstrated using a limited sample.

Key words: factor VIII activity; blood plasma; thawing

For citation: Lemondzhava V.N., Sidorkevich S.V., Kasyanov A.D. A one-stage clotting assay for measuring factor VIII activity in assessing the safety of donor fresh frozen blood plasma after thawing. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (7): 324-331 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-7-324-331>

For correspondence: Lemondzhava V.N., Senior Researcher, Research and Development Department of Medical Equipment, LLC "Scientific and Production Organization "BIOMEDTECH"; e-mail: lemonjava.vahtang@gmail.com

Information about authors:

Lemondzhava V.N., <https://orcid.org/0000-0002-6796-4037>;

Sidorkevich S.V., <https://orcid.org/0000-0001-9931-9406>;

Kasyanov A.D., <https://orcid.org/0000-0002-3597-664X>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation grant № 23-29-00385, <https://rscf.ru/en/project/23-29-00385/>.

Received 05.04.2024

Accepted 22.05.2024

Published 25.06.2024

Введение. Фактор VIII (далее FVIII) является компонентом внутреннего механизма свертывания крови [1] и представляет собой одноцепочечный белок с доменной структурой [2]. Одной из характеристик FVIII, которая подвергается рутинному клиническому лабораторному анализу, является его активность [3]. Существуют различные цели определения этого показателя. В гематологии исследование активности FVIII используется для диагностики гемофилии, а затем при мониторинге лечения [4]. При подозрении на наличие у пациентов ингибиторов FVIII проводятся дополнительные измерения уровня активности [5], от точности которых зависит оптимальность лечения гемофилии [6]. В производственной трансфузиологии активность FVIII является одним из критериев показателей качества свежемороженой [7], патогенредуцированной [8], патогенинактивированной [9] и лиофилизированной [10] плазмы, а также криопреципитата [11]. На основе результатов лабораторного анализа принимается решение о безопасности применения в медицинской практике той или иной партии вышеперечисленных трансфузионных веществ [12]. В связи с этим определение активности FVIII является важнейшим компонентом сравнительных исследований, проводимых с целью поиска способов достичь лучшей сохранности донорского биоматериала.

Результаты сравнительных исследований с различными режимами воздействий на плазму при хранении до замораживания [13], во время замораживания [14], при хранении после заморозки [15], во время оттаивания [16] и при хранении после оттаивания [17] позволяют выявлять условия для замедления активации FVIII. Он является одним из нестабильных факторов свертывания крови [18], уровень активности которого снижается нелинейно даже при постоянных условиях хранения [19]. При комнатной температуре статистически и клинически значимая разница активности FVIII показана уже между первыми часами хранения как

после венепункции [20], так и после оттаивания [21]. Анализ результатов повторного оттаивания образцов [22] позволяет представить существенную долю потерь, связанных с нагреванием замороженной плазмы крови. Однако, как показано ранее в нашем обзоре [7], результаты независимых исследований по оценке влияния интенсивности оттаивания на сохранность плазмы не согласуются. Одной из возможных причин этого может быть значительное влияние случайной погрешности в сравниваемых результатах измерений.

Точность, с которой можно определить изменение активности FVIII в экспериментальных образцах, зависит от разнообразных факторов во время подготовки к исследованию, при непосредственном измерении и в последующей обработке полученных данных. Среди многочисленных преаналитических переменных [23] в оценке влияния интенсивности оттаивания плазмы на изменение ее показателей критическое значение имеет точность обеспечения тепловых воздействий. Локальный перегрев образца может не только вызвать избыточную активацию нативного FVIII [24], но и стать причиной как незначительных конформационных изменений, так и полной термической денатурации [25]. Однако даже при высоком уровне повторяемости преаналитических операций межлабораторные результаты могут иметь расхождения по причине переменных на этапе измерения. Помимо индивидуальных особенностей методов [26], анализаторов [27] и партий реагентов [28], их комбинации [29] можно также считать независимыми переменными. Кроме того, погрешности измерения показателей образцов, сохранивших высокий уровень активности после оттаивания, может отличаться от погрешности с низким уровнем [30]. Учитывая это, количество повторных измерений в одном экспериментальном образце должно быть достаточным для постаналитического выявления единичных аномальных значений активности и систематических ошибок в результатах измерений. Иначе останется неисключенной возможность корреляции влияния таких

ошибок с истинным эффектом от воздействий. Наконец, проблема может заключаться в том, что суммарная погрешность измерений имеет большее влияние на сравниваемые выборки, чем эффект от воздействий, оцениваемых в исследовании и обеспечивающих разную интенсивность оттаивания плазмы.

Представленное исследование было направлено на уточнение знаний об ограничениях распространенного метода определения функциональной активности FVIII для предупреждения потенциальных ошибок в организации лабораторной службы. Целью работы являлась оценка применимости одностадийного клоттингового метода измерения активности FVIII в исследовании влияния термических и механических воздействий при размораживании человеческой плазмы крови на сохранность ее гемостатических показателей. В рамках этого исследования представляется значимым расширить знания о влиянии интенсивности нагревания вещества на лабораторный диагностический маркер гемофилии А. При организации лабораторной службы в преаналитический этап по необходимости включают термическую обработку образцов плазмы. Например, она используется как средство ограничения влияния введенного или эндогенного фактора VIII на реакцию свертывания крови для повышения точности измерения ингибиторов [31]. Однако представление об эффективности тепловых воздействий непосредственно связаны с накапливаемыми знаниями о свойствах термолабильного фактора VIII, проявляемых в лабораторных условиях под влиянием различной интенсивности нагревания плазмы крови.

Материал и методы. Для создания экспериментальных образцов была использована донорская кровь. Лица, сдавшие биоматериал, соответствовали требованиям, предъявляемым к донорам цельной крови, и отбирались случайным образом. Ими оказались четверо мужчин от 30 до 34 лет. Кровь собиралась во время донации в полимерный контейнер с раствором лимонной кислоты, цитрата натрия и декстрозы стандартной формулы А в качестве антикоагулянта. Затем кровь разделили на компоненты путем центрифугирования 15 минут со скоростью 4000 об/мин с использованием устройства «Sorvall RC-3BP Plus» (Thermo Fisher, США). Из плазмы каждого донора создали по два аналитических образца для измерения исходной активности FVIII и по два экспериментальных образца. Измерения исходных показателей выполняли одновременно на автоматическом коагулометре «ACL TOP 300» (IL Werfen, США) с использованием реаген-

та «HemosIL Factor VIII deficient plasma 0020012800» (Werfen S.A., Испания). Объем каждого из 8 созданных экспериментальных образцов был равен 110 мл. Их замораживали в стандартных полимерных контейнерах, предназначенных для длительного хранения донорских компонентов крови, с использованием установки «KLF 12-18/40» (MABAG, Германия). Хранение до размораживания осуществлялось 185 суток при температуре -30 °С в медицинском морозильнике «MDF-U5411» (Sanyo, Япония).

Во избежание типичных ошибок преаналитического этапа лабораторного исследования во время хранения образцов [32], транспортировки [33] и при контроле температурных параметров прочих технологических процессов [34], в представленной работе все операции были единообразными. Отклонение от контролируемых временных или температурных параметров, установленных в программе и методике исследования, являлось основанием для исключения образца из работы. На преаналитическом этапе только оттаивание образцов являлось вариативной технологической операцией. Замороженные образцы плазмы подвергались нагреванию до +36,6 °С с разной скоростью. Для этого использовалась экспериментальная установка, основным элементом которой была автоматизированная система оттаивания компонентов крови [35]. Ее стандартными настройками являются: поддержание температуры теплоносителя не выше +37 °С и горизонтальное возвратно-поступательное встряхивание контейнеров с частотой 60 циклов в минуту. Для обеспечения вариативности оттаивания образцов был разработан и интегрирован в систему технологический задатчик. С его помощью можно было повышать частоту механических воздействий и устанавливать двухэтапную задачу терморегулирования. Последнее позволило на первом этапе оттаивания поддерживать более высокую температуру теплоносителя с постепенным снижением до стандартного ограничения, избегая локального превышения температуры плазмы +37 °С. Допустимые величины тепловых воздействий и продолжительность изменения усредненного значения температуры образца от -30 °С до +36,6 °С были определены по методике, описанной в нашей предыдущей работе [36]. Характеристики воздействий на образцы, применяемые в представленной работе, приведены в табл. 1. Каждый первый парный образец подвергался стандартной процедуре оттаивания, а второй - одному из четырех высокоинтенсивных режимов нагревания.

Таблица 1

Характеристики воздействий на образцы, обеспечивающих вариативное оттаивание плазмы в исследовании

№	Условное название воздействий	Исходная температура теплоносителя, °С	Встряхивание, количество в минуту	Время, с
1	Стандартное	+37,0	60	539
2	Повышенное термическое	+37,4	60	382
3	Повышенное термическое и механическое	+37,4	120	318
4	Повышенное механическое	+37,0	120	338
5	Дважды повышенное механическое	+37,0	180	326

Выбор значения целевой температуры образцов обусловлен стремлением избежать снижения активности FVIII из-за процесса девитализации при более высоких температурах [18]. Обеспечением разной скорости изменения усредненной температуры образцов плазмы от -30 °С до +36,6 °С достигается возможность анализа влияния интенсивности нагревания на активность FVIII. Предполагается, что тем самым может быть найден более эффективный способ достижения температуры инкубации образцов для распространенных лабораторных исследований. Например, в рамках преаналитической термической обработки образцов, используемой совместно с анализом Неймегена-Бетесды [31], или перед повторным тестированием на коагуляцию [18].

После оттаивания экспериментальных образцов плазмы герметичные контейнеры прокалывали и извлекали аналитические образцы для повторного измерения активности FVIII на автоматическом коагулометре. Наибольший исследовательский интерес представляла та часть экспериментального образца внутри контейнера, в которой сохранность показателя была наименьшей из-за неравномерности температуры по объему. Поэтому область для взятия аналитического образца соответствовала зоне с максимальной температурой плазмы при нагревании. Координаты зон экстремумов температуры определяли по методике, описанной нами в предшествующей работе [36].

Диаграммы размаха выполнены в программе «Jamovi» версии 2.3.28. Для сравнительной оценки серий повторных лабораторных измерений активности FVIII были вычислены коэффициенты вариации аналогично работе [37]. В случаях, когда они превышали значение соответствующего коэффициента, указанного в описании реагента, проводился поиск единичных аномальных значений активности FVIII среди результатов замеров. Их выявление осуществлялось путем поочередного исключения результатов из выборки с последующим пересчетом и повторным сопоставлением коэффициентов. Аномальные значения не исключались из групп сравнения, чтобы продемонстрировать их влияние на оценку сохранности донорской свежезамороженной плазмы крови после оттаивания. Процент-

ное изменение между исходным значением активности FVIII и итоговым после оттаивания, было рассчитано по формуле, приведенной в работе [20].

Результаты. Результаты измерения исходных значений активности FVIII в четырех парах экспериментальных образцов плазмы с указанием обезличенной информации о донорах, которая относится к числу переменных преаналитического этапа [23], представлены в табл. 2. Средние значения показателя в каждой паре образцов были в пределах референсного диапазона, определяемого в интервале от 70 до 150% [38]. Значения исходной активности FVIII в образцах плазмы приведены также в виде диаграмм размаха на рисунке для визуализации вариативности результатов измерения.

Внутрисерийные коэффициенты вариации в показателях двух из четырех пар были выше ожидаемого значения по описанию реагента, равного 3,8%. В третьей паре он оказался равен 20,8%, а в четвертой - 4,4%.

Таблица 2

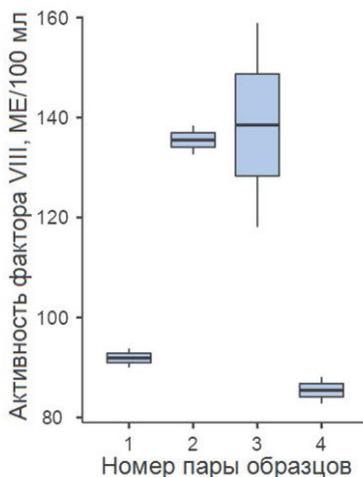
Сведения о четырех парах экспериментальных образцов плазмы крови, которые были определены до замораживания

№	FVIII (среднее±SD*), МЕ/100 мл	Возраст донора, годы	Группа крови
1	91,9±2,7	34	A(II)
2	135,5±4,1	30	A(IV)
3	138,5±28,9	34	A(IV)
4	85,4±3,8	30	A(II)

Примечание. *SD - стандартное отклонение.

В таблице 3 приведены результаты измерения активности FVIII после оттаивания образцов плазмы с разной интенсивностью в сопоставлении с вычисленной величиной изменения показателей относительно исходных значений. По результатам анализа измерений были выявлены единичные аномальные значения показателя в двух группах сравнения. Один из результатов измерений в третьей паре экспериментальных образцов до замораживания был аномальным, а в четвертой аномальные значения были выявлены как до, так и после оттаивания. При этом тенденций к постепенному повышению или понижению результатов, что могло бы свидетельствовать о систематической ошибке [39], не было, а аномальные значения были как по одну, так и по другую сторону от средних.

Активность FVIII в образцах, подвергавшихся высокоинтенсивному оттаиванию, была выше, чем в образцах, нагревание которых было выполнено по стандартной процедуре. В первой и второй паре, не имевших единичных аномальных значений в результатах измерений, разница была равна 4,7 и 9,9 МЕ/100 мл, что в процентном отношении к средним исходным значениям составляло 5,1 и 7,3% соответственно. В третьей паре разница была равна 3,4 МЕ/100 мл. Если учитывать аномальные значения показателя до замораживания, то в процентном отношении к среднему исходному значению разница между режимами нагревания составляет всего 2,5% и 2,1%, если не учитывать значительно отличающийся единичный результат среди повторных замеров. В четвертой паре аналогич-



Диаграммы размаха исходных значений активности фактора VIII в четырех парах образцов плазмы крови.

ная оценка разницы воздействий является несущественной из-за значительного влияния случайной по-

грешности на результаты измерения активности FVIII до и после оттаивания образцов.

Таблица 3

Сведения об изменении активности FVIII после оттаивания образцов плазмы

Пара	Воздействие	FVIII после оттаивания, МЕ/100 мл	Разность FVIII до и после оттаивания, МЕ/100 мл	Процентное изменение после оттаивания, %
1	Повышенное термическое (Стандартное)	87,3 (82,6)	4,6 (9,3)	5 (10,1)
2	Повышенное термическое и механическое (Стандартное)	134,3 (124,4)	1,2 (11,1)	0,9 (8,2)
3	Повышенное механическое (Стандартное)	153,5 (150,1)	-15 (-11,6)	10,8 (8,4)
4	Дважды повышенное механическое (Стандартное)	102,9 (85,4)	-17,5 (0)	20,5 (0)

Обсуждение. В представленной работе превышение фактической внутрисерийной вариации результатов над ожидаемой по описанию реагента, было надежным маркером для выявления аномальных значений при многократных повторных измерениях активности FVIII одностадийным клоттинговым методом. Наличие таких значений в выборках сравнения исходных показателей с итоговыми, приводит к несогласующимся результатам. Из-за аномальных значений в третьей и четвертой паре образцов разница между активностью FVIII до и после оттаивания имеет отрицательное значение или равна нулю. Это не согласуется с результатами изменения показателя в первой и второй паре образцов, а также с результатами других исследований [16,22], из которых известно о неизбежном снижении активности FVIII под влиянием воздействий при замораживании и оттаивании донорской плазмы крови. Приведенный пример позволяет предположить, что результаты измерений, аналогичные тем, которые были признаны в представленной работе аномальными, могли стать причиной расхождений между результатами независимых исследований, рассмотренных в обзоре [7].

Помимо внутрисерийной вариации результатов, следует обратить внимание на еще один критерий достоверности измерений в рамках сравнительных рандомизированных исследований с использованием одностадийного клоттингового метода. В таких исследованиях для проверки гипотез, как правило, необходимо разнообразие образцов биоматериала, например, по полу, возрасту и группе крови донора. Однако перед формированием выборок сравнения важно убедиться в достоверности измеренных показателей в пределах каждой донации. Как показано в представленной работе, неестественное изменение активности FVIII после оттаивания может являться основанием для поиска аномальных значений среди результатов одновременных повторных измерений исходных показателей и итоговых. Таким образом, при сравнении режимов оттаивания существует значительный вклад повторного измерения именно исходных показателей образцов не только в минимизацию выборки и достижение требуемой статистической мощности, как уже ранее отмечалось [40], но и в обнаружение аномальных результатов.

В дополнение к выводам предшествующего ис-

следования следует заметить значительную ценность информации об ограничениях методов измерений активности FVIII не только для перечисленных в работе сторон взаимодействия [41], но и для производителей лабораторной техники. Оптимизация устройств, обеспечивающих те или иные технологические операции с компонентами крови, осуществляется с учетом накопленных знаний об изменении гемостатических показателей под влиянием различных величин воздействий. В продолжение поиска эффективных величин воздействий для оттаивания свежемороженой плазмы крови при +37 °C и +45 °C [16] были получены значимые результаты. Измерения в первой и второй паре образцов в представленной работе показывают, что использование определенных комбинаций воздействий, в том числе исходной температуры теплоносителя выше +37 °C, могут приводить к лучшей сохранности биоматериала при оттаивании по сравнению со стандартной процедурой. При этом нагревание с повышенным термическим воздействием сократило продолжительность изменения средней температуры образцов от -30 °C до +36,6 °C на 157 секунд, а повышенное термическое и механическое воздействие - на 221 секунду. В процентном отношении к продолжительности стандартной процедуры это составило 29,1% и 69,5% соответственно.

Таким образом, сформирован задел для будущего подтверждения наличия или отсутствия корреляционной зависимости между активностью FVIII в плазме и интенсивностью нагревания образца с использованием одностадийного клоттингового метода измерения. После проверки на ограниченном количестве образцов можно ожидать, что в полномасштабном исследовании влияние суммарной погрешности измерения на сравниваемые выборки будет также меньше, как и эффект от изменения интенсивности оттаивания как минимум в вышеприведенных пределах. Это позволит впоследствии дополнить накопленные знания о влиянии различных величин воздействий при преаналитической термообработке образцов плазмы на активность FVIII [42]. В частности, станет возможна демаркация потерь функциональной активности в результате инкубационного хранения от потерь по причине нагревания образцов, а также будет определен эффект от повышения интенсивности нагревания. Практическая ценность

недостающих знаний заключается в потенциальном совершенствовании мер, предпринимаемых при организации лабораторной службы на преаналитическом этапе, путем оптимизации термической обработки образцов плазмы, доступной на основе раскрытия неопределенностей в рассматриваемой области [42].

Представленное исследование имело ограничения. Во-первых, использовались образцы плазмы только тех лиц, которые соответствовали требованиям, предъявляемым к донорам цельной крови. Во-вторых, разнообразие и количество образцов были весьма малыми. В третьих, измерения активности FVIII одностадийным клоттинговым методом проводились только на автоматическом коагулометре «ACL TOP 300» с использованием реагента «HemosIL Factor VIII deficient plasma 0020012800». В четвертых, исследование не являлось многоцентровым. Однако полученных результатов достаточно для положительной оценки применимости одностадийного клоттингового метода измерения активности FVIII в продолжающемся исследовании влияния термических и механических воздействий при размораживании человеческой плазмы крови на сохранность ее гемостатических показателей.

Выводы:

1. Единичные аномальные значения в результатах измерения активности FVIII одностадийным клоттинговым методом могут приводить к принципиальным расхождениям выводов об изменении показателя под влиянием различных величин воздействий при оттаивании образцов донорской свежзамороженной плазмы крови.

2. Выявить аномальные значения можно путем мониторинга естественного снижения активности FVIII в пределах каждой донации с последующим анализом внутрисерийной вариации единовременных повторных измерений исходных и итоговых значений показателя.

3. Путем подбора достаточного числа единовременных повторных измерений можно обеспечить условия, при которых суммарная погрешность будет иметь меньшее влияние на сравниваемые выборки, чем эффект от воздействий, оцениваемых в исследовании и обеспечивающих разную интенсивность оттаивания плазмы.

4. Результаты ограниченного по масштабу исследования с применением одностадийного клоттингового метода свидетельствуют о существовании комбинаций воздействий, в том числе исходной температуры теплоносителя выше +37 °С, которые могут приводить к лучшей сохранности плазмы при оттаивании по сравнению со стандартной процедурой.

5. На основании вышеперечисленного, применимость одностадийного клоттингового метода измерения активности FVIII можно считать обоснованной в продолжающемся исследовании влияния термических и механических воздействий при размораживании человеческой плазмы крови на сохранность ее гемостатических показателей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Packebush M.H., Sanchez-Martinez S., Biswas S., Kc S., Nguyen K.H., Ramirez J.F. et al. Natural and engineered mediators of desiccation tolerance stabilize Human Blood Clotting Factor VIII in a dry state. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 4542. DOI: 10.1038/s41598-023-31586-9.
2. Anzengruber J., Feichtinger M., Bärnthaler P., Haider N., Ilas J., Pruck-

- ner N. et al. How full-length FVIII benefits from its heterogeneity - insights into the role of the B-domain. *Pharm. Res.* 2019; 36(5): 77. DOI: 10.1007/s11095-019-2599-2.
3. Church N., Leong L., Katterle Y., Ulbrich H.F., Noerenberg I., Kitchen S. et al. Factor VIII activity of BAY 94-9027 is accurately measured with most commonly used assays: Results from an international laboratory study. *Haemophilia.* 2018; 24(5): 823-32. DOI: 10.1111/hae.13564.
4. Marlar R.A., Strandberg K., Shima M., Adcock D.M. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-stage factor activity assays in haemophilia A and B. *Eur. J. Haematol.* 2020; 104(1): 3-14. DOI: 10.1111/ejh.13339.
5. Kim J.Y., You C.W. The prevalence and risk factors of inhibitor development of FVIII in previously treated patients with hemophilia A. *Blood Res.* 2019; 54(3): 204-9. DOI: 10.5045/br.2019.54.3.204.
6. Peyvandi F., Kenet G., Pekrul I., Pruthi R.K., Ramge P., Spannagl M. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(6): 1242-55. DOI: 10.1111/jth.14784.
7. Лемонджав В.Н., Четкин А.В., Гудков А.Г., Леушин В.Ю., Касьянов А.Д., Киселева Е.А. Термоллабильность фактора VIII в донорской свежзамороженной плазме крови. *Гематология и трансфузиология.* 2021; 66: 593-609. DOI: 10.35754/0234-5730-2021-66-4-593-609.
8. Wasiluk T., Rogowska A., Boczkowska-Radziwon B., Zebrowska A., Bolkun L., Piszcz J. et al. Maintaining plasma quality and safety in the state of ongoing epidemic - The role of pathogen reduction. *Transfus. Apher. Sci.* 2021; 60(1): 102953. DOI: 10.1016/j.transci.2020.102953.
9. Bubinski M., Gronowska A., Szykula P., Kluska K., Kuleta I., Ciesielska E. et al. Plasma pooling in combination with amotosalen/UVA pathogen inactivation to increase standardisation and safety of therapeutic plasma units. *Transfus. Med.* 2021; 31(2): 136-41. DOI: 10.1111/tme.12763.
10. Flaumenhaft E.J., Khat T., Marschner S. Retention of coagulation factors and storage of freeze-dried plasma. *Mil. Med.* 2021; 186(1): 400-7. DOI: 10.1093/milmed/usaa347.
11. Жибурт Е.Б., Чемоданов И.Г., Шестаков Е.А. Производство криопреципитата в России: прошлое, настоящее и будущее. *Гематология и трансфузиология.* 2019; 64(1): 16-20. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-1-16-20.
12. Varlamov O.O., Chuvikov D.A., Lemondzhava V.N., Gudkov A.G., Aladin D.V., Adamova L.E. et al. A software package supporting decision making on the safety of thermolabile blood components. *Biomed. Eng.* 2022; 55(5): 355-9. DOI: 10.1007/s10527-022-10135-0.
13. Winter K.M., Webb R.G., Mazur E., Ismay S., Marinakis D., Marks D.C. Increasing the time-to-freezing for clinical apheresis plasma meets quality specifications. *Vox. Sang.* 2023; 118(11): 993-6. DOI: 10.1111/vox.13532.
14. Runkel S., Hitzler W.E., Hellstern P. The impact of whole blood processing and freezing conditions on the quality of therapeutic plasma prepared from whole blood. *Transfusion.* 2015; 55(4): 796-804. DOI: 10.1111/trf.12914.
15. Zhao Y., Feng G., Zhang J., Gong R., Cai C., Feng L. Effects of pre-analytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 12179. DOI: 10.1038/s41598-017-11777-x.
16. Dhantole L., Dubey A., Sonker A. A study on factors influencing the hemostatic potential of fresh frozen plasma. *Asian J. Transfus. Sci.* 2019; 13(1): 23-9. DOI: 10.4103/ajts.AJTS.139.17.
17. Rijnhout T.W.H., Noorman F., De Kort B., Zoodsma M., Hoencamp R. Prolonged (post-thaw) shelf life of -80 °C frozen AB apheresis plasma. *Transfusion.* 2020; 60(8): 1846-55. DOI: 10.1111/trf.15963.
18. Liu C., Ling L., Huang X., Mi J., Liao J., Jia J. et al. Evaluation of Activated Partial Thromboplastin Time Mixing Studies Using Several Methods. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2022; 146(11): 1387-94. DOI: 10.5858/arpa.2021-0123-OA.
19. Farrugia A. Factor VIII manufactured from plasma—the ups and downs, and the up again: a personal journey—part 2: aspects of factor VIII manufacture from plasma. *Annals of Blood.* 2018; 3(2). DOI: 10.21037/aob.2018.02.05.
20. Linskens E.A., Devreese K.M.J. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int. J. Lab. Hematol.* 2018; 40(3): 292-303. DOI: 10.1111/ijlh.12784.
21. Gaudard M., Boissier E., Talon L., Douxfils J., Sapin A.F., Sinegre T.

- et al. Stability of coagulation parameters in plasma samples at room temperature after one freeze/thaw cycle. *Int. J. Lab. Hematol.* 2022; 44(3): 610-8. DOI: 10.1111/ijlh.13794.
22. Draman R., Yousuf R., Abdul Aziz S., Ding C.H., Zainol S., Leong C.F. A Preliminary study on coagulation parameters and sterility of thawed refrozen fresh frozen plasma. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2020; 36(1): 112-6. DOI: 10.1007/s12288-019-01171-0.
23. Gosselin R.C., Marlar R.A. Preanalytical variables in coagulation testing: setting the stage for accurate results. *Semin. Thromb. Hemost.* 2019; 45(5): 433-48. DOI: 10.1055/s-0039-1692700.
24. Fylling K.A., Tange J.L., Chen D., Pruthi R.K. Heat inactivation of extended half-life factor VIII concentrates. *Haemophilia.* 2019; 25(2): e130-e131. DOI: 10.1111/hae.13700.
25. Brown H.C., Gangadharan B., Doering C.B. Enhanced biosynthesis of coagulation factor VIII through diminished engagement of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(27): 24451-7. DOI: 10.1074/jbc.M111.238758.
26. Zwagemaker A.F., Kloosterman F.R., Gouw S.C., Boyce S., Brons P., Cnossen M.H. et al. Little discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII (FVIII)/IX assays in a large international cohort of persons with nonsevere hemophilia A and B. *J. Thromb. Haemost.* 2023; 21(4): 850-61. DOI: 10.1016/j.jth.2022.11.040.
27. Strandberg K., Augustsson C. Evaluation of the Atellica COAG 360 coagulation analyzer in a specialized coagulation laboratory. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(3): e24276. DOI: 10.1002/jcla.24276.
28. Lowe A.E., Jones R., Kitchen S., Geisen U., Rozsnyai G., Jilma P. et al. Multicenter performance evaluation and reference range determination of a new one-stage factor VIII assay. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(4): e24294. DOI: 10.1002/jcla.24294.
29. van Moort I., Meijer P., Priem-Visser D., van Gammeren A.J., Péquériau N.C.V., Leebeek F.W.G. et al. Analytical variation in factor VIII one-stage and chromogenic assays: Experiences from the ECAT external quality assessment programme. *Haemophilia.* 2019; 25(1): 162-9. DOI: 10.1111/hae.13643.
30. Akkaya E., Hatiboglu S., Koc B., Genc S., Unuvar A., Karaman S. et al. Evaluation of chromogenic factor VIII assay compared with one-stage clotting assay. *Clin. Lab.* 2020; 66(10). DOI: 10.7754/Clin. Lab.2020.191145.
31. Boylan B., Miller C.H. Effects of pre-analytical heat treatment in factor VIII (FVIII) inhibitor assays on FVIII antibody levels. *Haemophilia.* 2018; 24(3): 487-91. DOI: 10.1111/hae.13435.
32. Пискунов Д.П., Данилова Л.А., Пушкин А.С., Рукавишников С.А. Влияние экзогенных и эндогенных факторов на качество преаналитического этапа лабораторных исследований (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020; 65(12): 778-84. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-12-778-784.
33. Козлова В.А., Покровская М.С., Мешков А.Н., Драпкина О.М. Современные подходы к транспортировке биообразцов при низких температурах. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2020; 65(10): 619-25. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625.
34. Лемондзхава В.Н., Гудков А.Г., Леушин В.Ю., Четчин А.В., Касьянов А.Д. Информационные технологии мониторинга технологических операций в цепочке от момента донации до момента трансфузии донорских компонентов крови. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 66(54): 38-9.
35. Lemondzhava V.N., Leushin V.Y., Khalapsina T.M., Agasieva S.V., Gorlacheva E.N., Chizhikov S.V. et al. Automated Systems for Thawing Cryopreserved Blood Components. *Biomed. Eng.* 2018; 51(6): 385-8. DOI: 10.1007/s10527-018-9755-6.
36. Lemondzhava V.N., Lemondzhava T.Yu., Gudkov A.G., Shashurin V.D., Leushin V.Yu., Kasyanov A.D. Technological optimization of the process of preparation of fresh frozen blood plasma to transfusion in devices for its thermal processing. *AIP Conference Proceedings.* 2023; 2605(1): 020013. DOI: 10.1063/5.0110400.
37. Мухамеджанова Н.И., Арипов О.А. Внешняя оценка качества клинико-диагностических лабораторий. Возможные источники ошибок. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64(1): 42-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-1-42-45.
38. Потылицина В.В., Самойленко В.В., Лобанова С.М., Ольховский И.А., Пальгова И.В. К вопросу использования методов фактор-параллелизма и индекса циркулирующего антикоагулянта в алгоритме диагностики дефицита факторов свертывания. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2019; 64(2): 83-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-2-83-88.
39. Padmore R., Petersen K., Campbell C., Chennette M., Sabourin A., Shaw J. Practical application of mathematical calculations and statistical methods for the routine haematology laboratory. *Int. J. Lab. Hematol.* 2022; 44(1): 11-20. DOI: 10.1111/ijlh.13934.
40. Ma S., Wang T. The optimal pre-post allocation for randomized clinical trials. *BMC Med. Res. Methodol.* 2023; 23: 72. DOI: 10.1186/s12874-023-01893-w.
41. Adcock D.M., Strandberg K., Shima M., Marlar R.A. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int. J. Lab. Hematol.* 2018; 40(6): 621-9. DOI: 10.1111/ijlh.12877.
42. Batty P., Hart D.P., Platten S. Optimization of pre-analytical heat treatment for inhibitor detection in haemophilia A. *Int. J. Lab. Hematol.* 2018; 40(5): 561-8. DOI: 10.1111/ijlh.12862.

REFERENCES

1. Packebush M.H., Sanchez-Martinez S., Biswas S., Kc S., Nguyen K.H., Ramirez J.F. et al. Natural and engineered mediators of desiccation tolerance stabilize human blood clotting factor VIII in a dry state. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 4542. DOI: 10.1038/s41598-023-31586-9.
2. Anzengruber J., Feichtinger M., Bärthaler P., Haider N., Ilas J., Pruckner N. et al. How full-length FVIII benefits from its heterogeneity - insights into the role of the B-domain. *Pharm. Res.* 2019; 36(5): 77. DOI: 10.1007/s11095-019-2599-2.
3. Church N., Leong L., Katterle Y., Ulbrich H.F., Noerenberg I., Kitchen S. et al. Factor VIII activity of BAY 94-9027 is accurately measured with most commonly used assays: Results from an international laboratory study. *Haemophilia.* 2018; 24(5): 823-32. DOI: 10.1111/hae.13564.
4. Marlar R.A., Strandberg K., Shima M., Adcock D.M. Clinical utility and impact of the use of the chromogenic vs one-stage factor activity assays in haemophilia A and B. *Eur. J. Haematol.* 2020; 104(1): 3-14. DOI: 10.1111/ejh.13339.
5. Kim J.Y., You C.W. The prevalence and risk factors of inhibitor development of FVIII in previously treated patients with hemophilia A. *Blood Res.* 2019; 54(3): 204-9. DOI: 10.5045/br.2019.54.3.204.
6. Peyvandi F., Kenet G., Pekrul I., Pruthi R.K., Ramge P., Spannagl M. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on coagulation assays. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(6): 1242-55. DOI: 10.1111/jth.14784.
7. Lemondzhava V.N., Chechetkin A.V., Gudkov A.G., Leushin V.Yu., Kasianov A.D., Kiseleva E.A. Thermolability of factor VIII in donor fresh frozen blood plasma. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2021; 66: 593-609. DOI: 10.35754/0234-5730-2021-66-4-593-609. (in Russian)
8. Wasiluk T., Rogowska A., Boczkowska-Radziwon B., Zebrowska A., Bolkun L., Piszcz J. et al. Maintaining plasma quality and safety in the state of ongoing epidemic - the role of pathogen reduction. *Transfus. Apher. Sci.* 2021; 60(1): 102953. DOI: 10.1016/j.transci.2020.102953.
9. Bubinski M., Gronowska A., Szykula P., Kluska K., Kuleta I., Ciesielska E. et al. Plasma pooling in combination with amotosalen/UVA pathogen inactivation to increase standardisation and safety of therapeutic plasma units. *Transfus. Med.* 2021; 31(2): 136-41. DOI: 10.1111/tme.12763.
10. Flaumenhaft E.J., Khat T., Marschner S. Retention of coagulation factors and storage of freeze-dried plasma. *Mil. Med.* 2021; 186(1): 400-7. DOI: 10.1093/milmed/usaa347.
11. Zhiburt E.B., Chemodanov I.G., Shestakov E.A. Cryoprecipitate production in Russia: past, present and future. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2019; 64(1): 16-20. DOI: 10.35754/0234-5730-2019-64-1-16-20. (in Russian)
12. Varlamov O.O., Chuvikov D.A., Lemondzhava V.N., Gudkov A.G., Aladin D.V., Adamova L.E. et al. A software package supporting decision making on the safety of thermolabile blood components. *Biomed. Eng.* 2022; 55(1): 355-9. DOI: 10.1007/s10527-022-10135-0.
13. Winter K.M., Webb R.G., Mazur E., Ismay S., Marinakis D., Marks D.C. Increasing the time-to-freezing for clinical apheresis plasma meets quality specifications. *Vox. Sang.* 2023; 118(11): 993-6. DOI: 10.1111/vox.13532.
14. Runkel S., Hitzler W.E., Hellstern P. The impact of whole blood processing and freezing conditions on the quality of therapeutic plasma prepared from whole blood. *Transfusion.* 2015; 55(4): 796-804. DOI: 10.1111/trf.12914.
15. Zhao Y., Feng G., Zhang J., Gong R., Cai C., Feng L. Effects of pre-

- analytical frozen storage time and temperature on screening coagulation tests and factors VIII and IX activity. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 12179. DOI: 10.1038/s41598-017-11777-x.
16. Dhantole L., Dubey A., Sonker A. A study on factors influencing the hemostatic potential of fresh frozen plasma. *Asian J. Transfus. Sci.* 2019; 13(1): 23-9. DOI: 10.4103/ajts.AJTS_139_17.
 17. Rijnhout T.W.H., Noorman F., De Kort B., Zoodma M., Hoencamp R. Prolonged (post-thaw) shelf life of -80 °C frozen AB apheresis plasma. *Transfusion.* 2020; 60(8):1846-55. DOI: 10.1111/trf.15963.
 18. Liu C., Ling L., Huang X., Mi J., Liao J., Jia J. et al. Evaluation of Activated Partial thromboplastin time mixing studies using several methods. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2022; 146(11): 1387-94. DOI: 10.5858/arpa.2021-0123-OA.
 19. Farrugia A. Factor VIII manufactured from plasma—the ups and downs, and the up again: a personal journey—part 2: aspects of factor VIII manufacture from plasma. *Annals of Blood.* 2018; 3(2). DOI: 10.21037/aob.2018.02.05.
 20. Linskens E.A., Devreese K.M.J. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int. J. Lab. Hematol.* 2018; 40(3): 292-303. DOI: 10.1111/ijlh.12784.
 21. Gaudard M., Boissier E., Talon L., Douxfils J., Sapin A.F., Sinegre T. et al. Stability of coagulation parameters in plasma samples at room temperature after one freeze/thaw cycle. *Int. J. Lab. Hematol.* 2022; 44(3): 610-8. DOI: 10.1111/ijlh.13794.
 22. Draman R., Yousuf R., Abdul Aziz S., Ding C.H., Zainol S., Leong C.F. A Preliminary Study on Coagulation Parameters and Sterility of Thawed Refrozen Fresh Frozen Plasma. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 2020; 36(1): 112-6. DOI: 10.1007/s12288-019-01171-0.
 23. Gosselin R.C., Marlar R.A. Preanalytical variables in coagulation testing: setting the stage for accurate results. *Semin Thromb. Hemost.* 2019; 45(5): 433-48. DOI: 10.1055/s-0039-1692700.
 24. Fylling K.A., Tange J.I., Chen D., Pruthi R.K. Heat inactivation of extended half-life factor VIII concentrates. *Haemophilia.* 2019; 25(2): e130-e131. DOI: 10.1111/hae.13700.
 25. Brown H.C., Gangadharan B., Doering C.B. Enhanced biosynthesis of coagulation factor VIII through diminished engagement of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(27): 24451-7. DOI: 10.1074/jbc.M111.238758.
 26. Zwagemaker A.F., Kloosterman F.R., Gouw S.C., Boyce S., Brons P., Cnossen M.H. et al. Little discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII (FVIII)/IX assays in a large international cohort of persons with nonsevere hemophilia A and B. *J. Thromb. Haemost.* 2023; 21(4): 850-61. DOI: 10.1016/j.jtha.2022.11.040.
 27. Strandberg K., Augustsson C. Evaluation of the Atellica COAG 360 coagulation analyzer in a specialized coagulation laboratory. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(3): e24276. DOI: 10.1002/jcla.24276.
 28. Lowe A.E., Jones R., Kitchen S., Geisen U., Rozsnyai G., Jilma P. et al. Multicenter performance evaluation and reference range determination of a new one-stage factor VIII assay. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(4): e24294. DOI: 10.1002/jcla.24294.
 29. van Moort I., Meijer P., Priem-Visser D., van Gammeren A.J., Péquériau N.C.V., Leebeek F.W.G. et al. Analytical variation in factor VIII one-stage and chromogenic assays: Experiences from the ECAT external quality assessment programme. *Haemophilia.* 2019; 25(1): 162-9. DOI: 10.1111/hae.13643.
 30. Akkaya E., Hatiboglu S., Koc B., Genc S., Unuvar A., Karaman S. et al. Evaluation of Chromogenic Factor VIII Assay Compared with One-Stage Clotting Assay. *Clin. Lab.* 2020; 66(10). DOI: 10.7754/Clin. Lab.2020.191145.
 31. Boylan B., Miller C.H. Effects of pre-analytical heat treatment in factor VIII (FVIII) inhibitor assays on FVIII antibody levels. *Haemophilia.* 2018; 24(3): 487-91. DOI: 10.1111/hae.13435.
 32. Piskunov D.P., Danilova L.A., Pushkin A.S., Rukavishnikova S.A. Influence of exogenous and endogenous factors on the quality of the preanalytical stage of laboratory tests (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65(12): 778-84. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-12-778-784. (in Russian)
 33. Kozlova V.A., Pokrovskaya M.S., Meshkov A.N., Drapkina O.M. Actual approaches to the transportation of biological samples at low temperatures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2020; 65(10): 619-25. DOI: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-619-625. (in Russian)
 34. Lemondzhava V.N., Gudkov A.G., Leushin V.Yu., Chechetkin A.V., Kasianov A.D. Information technologies for monitoring technological operations in the chain from the initial donation to the final transfusion of donor blood components. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2021; 66(S4): 38-9. (in Russian)
 35. Lemondzhava V.N., Leushin V.Y., Khalapsina T.M., Agasieva S.V., Gorlacheva E.N., Chizhikov S.V. et al. Automated Systems for Thawing Cryopreserved Blood Components. *Biomed. Eng.* 2018; 51(6): 385-8. DOI: 10.1007/s10527-018-9755-6.
 36. Lemondzhava V.N., Lemondzhava T.Yu., Gudkov A.G., Shashurin V.D., Leushin V.Yu., Kasyanov A.D. Technological optimization of the process of preparation of fresh frozen blood plasma to transfusion in devices for its thermal processing. *AIP Conference Proceedings.* 2023; 2605(1): 020013. DOI: 10.1063/5.0110400.
 37. Mukhamedzhanova N.I., Aripov O.A. External quality assessment of clinical diagnostic laboratories. Possible sources of error. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64(1): 42-5. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-1-42-45. (in Russian)
 38. Potylitsina V.V., Samoilenko V.V., Lobanova S.M., Olkhovsky I.A., Palgova I.V. The issue of use parallelism factor method and index of circulating anticoagulant in diagnostic algorithm deficiency of coagulation factors. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2019; 64(2): 83-8. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-2-83-88. (in Russian)
 39. Padmore R., Petersen K., Campbell C., Chennette M., Sabourin A., Shaw J. Practical application of mathematical calculations and statistical methods for the routine haematology laboratory. *Int. J. Lab. Hematol.* 2022; 44(1): 11-20. DOI: 10.1111/ijlh.13934.
 40. Ma S., Wang T. The optimal pre-post allocation for randomized clinical trials. *BMC Med. Res. Methodol.* 2023; 23: 72. DOI: 10.1186/s12874-023-01893-w.
 41. Adcock D.M., Strandberg K., Shima M., Marlar R.A. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int. J. Lab. Hematol.* 2018; 40(6): 621-9. DOI: 10.1111/ijlh.12877.
 42. Batty P., Hart D.P., Platton S. Optimization of pre-analytical heat treatment for inhibitor detection in haemophilia A. *Int. J. Lab. Hematol.* 2018; 40(5): 561-8. DOI: 10.1111/ijlh.12862.