

ГБУЗ Научно – исследовательский институт скорой помощи имени  
Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы

на правах рукописи

Макаров Максим Сергеевич

Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека  
в норме и патологии

14.01.21 – гематология и переливание крови

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

профессор, доктор медицинских наук

Хватов Валерий Борисович

Москва – 2013

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	1
СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Морфологическая характеристика тромбоцитов человека.....»	
1.2. Методы морфометрической оценки фиксированных тромбоцитов.....	19
1.3. Методы морфофункциональной оценки нефиксированных тромбоцитов.....	22
1.3.1. Методы агрегометрии.....»	
1.3.2. Методы проточной цитометрии.....	24
1.3.3. Морфофункциональная оценка тромбоцитов с помощью фазово- интерференционной микроскопии.....	25
1.4. Использование витального окрашивания для морфофункциональной оценки тромбоцитов человека.....	27
1.4.1. Использование витальных красителей в клеточной биологии.. .... »	
1.4.2. Исследование клеточных компонентов крови с помощью витальных красителей.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1. Объект исследования.....»	
2.2. Приготовление витального красителя.....	36
2.3. Микроскопия.....	37
2.4. Цитометрия.....	38
2.5. Исследование агрегационной активности тромбоцитов .....	»

2.6. Оценка пролиферативной активности клеток человека в присутствии тромбоцитов.....	39
2.7. Статистический анализ.....	40
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
Глава 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ .....	»
3.1. Выбор витальных красителей для дифференциального окрашивания тромбоцитов человека.....	»
3.2. Анализ функциональной активности витально окрашенных тромбоцитов.....	42
3.3. Оценка жизнеспособности витально окрашенных тромбоцитов.....	44
3.4. Параметры оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека.....	46
3.5. Оценка популяции витально окрашенных тромбоцитов с помощью проточной цитометрии.....	48
3.6. Сравнение морфофункциональных параметров тромбоцитов с их активностью.....	50
3.7. Оценка рост-стимулирующего действия тромбоцитов с помощью морфофункционального анализа клеток.....	52
Глава 4. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИТАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ТРОМБОЦИТОВ.....	59
4.1. Морфология тромбоцитов.....	»
4.2. Морфофункциональные свойства витально окрашенных тромбоцитов в зависимости от интенсивности свечения.....	62

4.3. Структура тромбоцитов после индуцированной агрегации.....	65
Глава 5. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ТРОМБОЦИТОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ .....	69
5.1. Морфофункциональный анализ тромбоцитов доноров.....»	
5.2. Оценка морфофункционального статуса тромбоцитов доноров в процессе хранения.....	71
5.3. Морфофункциональный анализ тромбоцитов при различных патологических состояниях.....	77
5.4. Прогнозирование развития геморрагического синдрома у гематологических больных с тромбоцитопенией.....	81
5.5. Влияние процедуры ИК на морфофункциональный статус тромбоцитов человека.....	84
5.6. Влияние антиагрегантов на морфофункциональный статус тромбоцитов человека .....	88
6. ОБСУЖДЕНИЕ.....	96
7. ВЫВОДЫ.....	107
8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	113

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААТ – адгезивная активность тромбоцитов

АО – акридиновый оранжевый

БоТП – богатая тромбоцитами плазма

ГС – геморрагический синдром

ДМСО – диметилсульфоксид

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИК – искусственное кровообращение

КТ – концентрат тромбоцитов

МФАТ – морфофункциональная активность тромбоцитов

МФСТ – морфофункциональный статус тромбоцитов

ОКС – острый коронарный синдром

ОСК – открытая система канальцев

ПСК – плотная система канальцев

Стр. – концентрация тромбоцитов

Стр.гр. – концентрация тромбоцитов с гранулами

ТБГ – тромбоциты богатые гранулами

Тр.отр. – содержание отростчатых тромбоцитов

ЧТТ – чувствительность тромбоцитов крови к тикагрелору

Дтр.гр. – доля тромбоцитов с гранулами

PDGF – platelet derived growth factor (тромбоцитарный фактор роста)

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

Успехи современной медицины, стремительный рост хирургической активности, особенно у наиболее тяжелого контингента больных, определяют применение в клинической практике различных методов трансфузиологической клеточной гемокоррекции (В.Б. Хватов, 2003, 2011; Г.И. Козинец, 2005; Н.Н. Калинин, 2006; А.А. Рагимов, И.Н. Соловьева, 2008; В.М. Погорелов, Г.И. Козинец, 2012). Тромбоциты человека широко используются в гематологии, трансфузиологии, хирургии, реаниматологии, акушерстве и гинекологии, в педиатрии и неонатологии, травматологии, трансплантологии, кардиохирургии, гепатологии (А.И. Воробьев, 2002; А.Г. Румянцев, В.А. Аграненко, 2002; Е.Б. Жибурт, П.В. Рейзман, С.А. Голосова, 2005; А.А. Рагимов, 2012; A.D. Shapiro, 1999; S.J. Slichter, 2004). Под "защитой" переливаний концентрата тромбоцитов проводятся курсы интенсивной химиотерапии с заранее планируемым периодом длительного агранулоцитоза и тромбоцитопении (Лебедева Е.А., Ефимова С.Ю., 2000; Г.И. Козинец, 2005; А.Л. Левит, Т.С. Константинова, А.И. Костин, 2005; В.М. Городецкий, М.Ж. Алексанян, М.Ж. Ватагина и соавт., 2012). Клиническое использование тромбоцитов человека для обеспечения адекватной компенсации нарушений в системе клеточного гемостаза и лечебной эффективности ставит проблему оценки биологической полноценности этих клеток (Ю.Л. Шевченко, Н.Б. Жибурт, 2008; V.Kehrel, M. Brodde, 2013). Существует технический регламент требований к безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии (приложение № 1 к постановлению правительства РФ № 29 от 26.01.2010 года). Однако в представленных параметрах нет данных, регламентирующих структурную целостность и функциональную активность тромбоцитов. Следовательно,

имеется необходимость разработки и внедрения метода адекватной оценки качества тромбоцитов, используемых в клинической практике, а также оценки их биологической полноценности в норме и патологии.

Тромбоцит представляет собой безъядерную высоко дифференцированную клетку с уникальными функциями. К ним относятся коагулологическая, ангиотрофическая, эндотелиальноподдерживающая, транспортная, рост-стимулирующая функции, участие в воспалении, репарации и регенерации (В.В. Долгов, П.В.Свирин, 2005; А.И.Мининкова, 2010, 2011; А.В. Мазуров, 2011; R.E.Marx, E.R.Carlson, R.M. Eichstaedt 1998; В.Н. Оболенский, Д.А. Ермолова, 2012). Морфологически в тромбоцитах выделяют четыре зоны: 1-я – надмембранный слой (гликокаликс); 2-я – плазматическая мембрана; 3-я зона – матрикс или гель-зона; 4-я – зона органелл, содержащая уникальную систему выводящих канальцев и гранул с биологически активными веществами, синтезируемыми и выделяемыми тромбоцитами (А.С.Шитикова, 2000). Морфологическое исследование фракции плотных гранул, фракции  $\alpha$ -гранул, фракции лизосом и канальцевой системы тромбоцитов человека позволяет адекватно оценить их морфофункциональный статус. Значимость такого подхода обосновано для диагностики различных типов тромбоцитопатий (А.Д.Шapiro, 1999). При этом исследование гранул тромбоцитов может служить интегральным параметром оценки их функции. Биологическая активность и функциональная полноценность тромбоцитов напрямую зависит от их морфологической целостности (А.В. Мазуров, 2011), поэтому наиболее достоверными методами оценки качества тромбоцитов считаются морфометрические и цитоморфометрические методы.

Существуют различные морфометрические методы оценки качества тромбоцитов человека с помощью световой (Ф.В. Коробова, Т.Н. Левина, Б.З. Соколинский, 2000), электронной (В.К. Вашкинель, М.Н. Петров, 1982; M.G. Egidì et al. 2010), и атомно-силовой микроскопии (М.Ю. Донников, С.А.Орлов, А.А. Зиновьев, 2009). Однако во всех этих методах применяется химическая

фиксация тромбоцитов, которая делает невозможной оценку их функциональной активности и не всегда позволяет достоверно оценить структурную целостность тромбоцита, поскольку при любой фиксации клеток происходят определенные изменения в их структуре (Б. Ромейс, 1954). Методы, в которых не требуется химическая фиксация клеток – фазово-контрастная и интерференционная микроскопия (И.А. Василенко и соавт, 2009; Е.И.Колосова, И.А.Василенко, Л.Г., Ковалева, 2011), проточная цитометрия (J. Delobel, O. Rubin, M. Prudent, 2010) – не позволяют напрямую связать регистрируемые параметры тромбоцитов с их основными функциями (агрегация, адгезия). Возникает проблема параллельной оценки целостности структуры тромбоцита и его функций, т.е. оценки морфофункционального статуса тромбоцита.

В клеточной биологии эта проблема решается путем использования витальных красителей, которые позволяют дифференциально выявить отдельные структурные компоненты клеток без нарушения их жизнедеятельности (B.Alberts, A.Johnson, J.Lewis et al, 2002). Витальное окрашивание клеток позволяет оценить различные формы клеточной активности – пролиферативную, секреторную, локомоторную (M.D.Pollard, W.C.Earnshaw, 2007) – а также целостность их внутреннего состава. Таким образом, имеются все основания к разработке и внедрению витальных красителей для оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека.

**Цель работы.** На основе витального окрашивания разработать метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека для характеристики биологической полноценности этих клеток в норме и патологии.

### **Задачи исследования:**

1. Разработать метод витального окрашивания тромбоцитов человека для оценки их морфофункционального статуса.
2. Разработать параметры оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека.
3. Провести морфологический анализ витально окрашенных тромбоцитов
4. Оценить морфофункциональный статус тромбоцитов человека в норме и патологии.

### **НАУЧНАЯ НОВИЗНА:**

Разработан витальный краситель клеток на основе флуорохромов триафлавина и акридинового оранжевого (АО), позволяющий получать во флуоресцентном микроскопе дифференциальное свечение цитоплазмы и гранул тромбоцитов без нарушения их активности. Анализ интенсивности свечения окрашенных триафлавином-АО тромбоцитов позволяет оценить их морфологию, целостность внутреннего состава, насыщение гранулами и мембранными структурами. Функционально полноценными являются тромбоциты с интенсивностью свечения 40-80 фут-кандел (баллов), содержащие более 3 гранул. Отсутствие свечения гранул в тромбоцитах связано с их активацией или повреждением.

Впервые в крови человека выявлена популяция клеток – тромбоциты богатые гранулами, обладающие повышенной морфофункциональной, адгезивной и агрегационной активностью, высоко устойчивые к токсическому действию ДМСО. Впервые разработан оригинальный способ оценки качества тромбоцитов, включающий исследование морфофункциональной активности тромбоцитов, выражающую структурную полноценность клеток, и морфологический анализ адгезивной активности клеток, в сумме отражающие функциональную полноценность тромбоцитов. Способ оценки

морфофункционального статуса тромбоцитов защищен Патентом РФ на изобретение №2485502 от 20.06.2013.

Впервые представлен анализ распределения доноров крови по биологической полноценности тромбоцитов. Выявлены три популяции: с референтным (82%), повышенным (2%) и пониженным уровнем (16%) морфофункционального статуса тромбоцитов. При этом относительное содержание функционально полноценных клеток в концентратах тромбоцитов, полученных от доноров 1-й и 2-й популяции, составляло 55-60%, тогда как от доноров 3-й популяции – не более 43%. Установлена взаимосвязь между морфофункциональными характеристиками тромбоцитов и их влиянием на пролиферативную активность культивируемых клеток.

Проведен анализ морфофункционального статуса тромбоцитов (МФСТ) у пациентов с различными патологиями, установлено, что при ряде патологий наблюдается достоверное изменение морфофункциональных параметров тромбоцитов. Показано нарушение структурной целостности и функциональной активности тромбоцитов (при гематологических заболеваниях, острых экзогенных отравлениях, процедуре искусственного кровообращения); степень снижения количества циркулирующих функционально пригодных клеток (при массивных кровотечениях); гиперактивация клеток (при тромбозах). Установлено, что снижение МФСТ у кардиохирургических больных после оперативного вмешательства с применением аппарата искусственного кровообращения не связано с уменьшением концентрации тромбоцитов в циркулирующей крови.

Разработан способ оценки чувствительности тромбоцитов крови к антиагрегантам как прямого, так и непрямого действия, которые вызывают снижение адгезивной активности тромбоцитов при сохранении их морфофункциональной активности. Степень чувствительности тромбоцитов крови к антиагрегантам широко варьирует у разных пациентов. Показана неоднородность популяции здоровых людей и пациентов с

кардиохирургическими заболеваниями по степени чувствительности тромбоцитов к действию антиагрегантов.

Предложенный способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека является объективной оценкой биологической полноценности клеток и перспективен для использования в производственной трансфузиологии и клинической практике.

## **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ:**

Определены референтные значения морфофункциональных параметров витально окрашенных тромбоцитов, соответствующие норме. Получено авторское свидетельство «Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека», разработаны методические рекомендации «Применение аппликаций богатой тромбоцитами аутоплазмы в лечении больных с хроническими ранами различной этиологии». Предложенный способ оценки тромбоцитов используется в клинической практике.

Оценка морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью витального окрашивания позволяет оценить качество тромбоцитов, используемых в клинической практике, определить биологическую полноценность и функциональную активность тромбоцитов в крови больного для коррекции и прогнозирования дальнейшей терапии.

## **ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:**

1. Разработан метод витального окрашивания тромбоцитов человека с помощью трипафлавина-АО, позволяющий дифференциально окрасить цитоплазму и гранулы этих клеток без нарушения их биологической полноценности. На основе витального окрашивания разработан метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека, который позволяет проводить параллельный анализ их структурной целостности и функциональной активности.
2. Выявлена неоднородность витально окрашенных тромбоцитов по биологической полноценности. Окраска трипафлавином-АО позволила выявить клетки разных морфологических типов. Функционально полноценными являются только дискоциты и большие округлые тромбоциты с гранулами. Функционально полноценные клетки различаются по интенсивности свечения. Выявлены тромбоциты, обогащенные гранулами и мембранными структурами, которые обладают повышенной устойчивостью к действию ДМСО.
3. Определены рефернтные значения морфофункциональных параметров тромбоцитов, определяющие норму. Популяция доноров является неоднородной по уровню МФСТ. Сохранность КТ доноров в ходе хранения при 22°C и криоконсервировании зависит от исходных морфофункциональных параметров тромбоцитов.
4. В ряде заболеваний наблюдается достоверное изменение параметров МФСТ. У больных с клинически выраженным геморрагическим синдромом значения МФСТ резко снижены, у больных с тромбозами – заметно повышены по сравнению с донорами. Анализ МФСТ позволяет объективизировать проведение трансфузий тромбоцитов пациентам с тромбоцитопениями. Анализ МФСТ позволяет оценить чувствительность

тромбоцитов человека к препаратам-антиагрегантам прямого и непрямого действия.

## АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты исследования были представлены в виде устных и стендовых сообщений на отечественных и международных конгрессах и симпозиумах: V юбилейная конференция «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2012); Конгресс гематологов России-2012 (Москва, 2012); VI научно-практическая конференция «Современная гематология. Проблемы и решения» (Москва, 2012); VI всероссийская конференция «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (Москва, 2013).

## ПУБЛИКАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 9 статей, из них 6 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов в сборниках конференций.

## СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация изложена на 127 страницах, состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; материалы и методы; результаты; обсуждение; выводы; список литературы, включающий 132 источников, из них 55 отечественных и 77 зарубежных. Диссертация содержит 10 таблиц и 29 рисунков.

Диссертационная работа выполнена в научной лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования (зав. д.м.н. Н.В. Боровкова), научной лаборатории трансфузиологии, консервирования тканей и искусственного питания (зав. д.м.н., профессор В.Б.Хватов) ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

Тромбоциты человека – это безъядерные высокодифференцированные и высокоспециализированные клетки, обладающие уникальным строением и функциями. Проявление тромбоцитами функциональной активности сопровождается кардинальным изменением их внутренней структуры, поэтому при изучении морфологии тромбоцитов принято выделять клетки стадии “покоя” (исходные неактивированные тромбоциты) и клетки, находящиеся на разных стадиях активации.

Тромбоциты стадии “покоя” описывают как мелкие дисковидные клетки диаметром 2-5 мкм [3,6]. Дисковидную форму тромбоцитов можно отчетливо наблюдать на нефиксированных препаратах с помощью световой микроскопии. На фиксированных препаратах, окрашенных по Романовскому, тромбоциты имеют вид пластинок многоугольной, реже овальной формы, в которых выявляется периферическая часть – гиаломер, и центральная часть – грануломер, содержащая гранулы. В норме гиаломер имеет базофильную окраску, грануломер – оксифильную [25,36,42]. На ультраструктурном уровне в составе гиаломера выявляются элементы цитоскелета – микротрубочки и актин-миозиновые комплексы, определяющие форму тромбоцитов в стадии покоя и при активации [3,7,31]. Грануломер содержит очень мелкие митохондрии с 1-2 кристами, скопления гликогена, 2 типа мембранных систем (открытая канальцевая система и плотная канальцевая система), некоторое количество лизосом и пероксисом, а также секреторные везикулы, или гранулы (рис.1). Элементы вакуолярной системы, участвующие в синтезе и созревании белков (гранулярный эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи), в тромбоцитах не присутствуют или присутствуют в виде мелких остаточных форм, которые выявляются лишь при определенных патологиях.

Считается, что все секреторные тромбоцитарные белки синтезируются еще на стадии мегакариоцитов[31].

Открытая система канальцев (ОСК) представляет собой сеть, состоящую из одномембранных канальцев и туннелей, которая пронизывает значительную часть объема тромбоцита и имеет контакт с плазматической мембраной [6,31]. В состав мембран ОСК входят многие рецепторные белки и молекулы адгезии; при активации тромбоцита наблюдается диффузия этих белков из ОСК в сторону плазматической мембраны, а различных мембранных компонентов – в обратном направлении, т.о. ОСК осуществляет перераспределение мембранных компонентов внутри тромбоцитов [31]. Кроме того, ОСК участвует в экзоцитозе секреторных везикул и, по всей видимости, в эндоцитозе некоторых белков плазмы крови (фибронектин, альбумины, иммуноглобулины)[2,35,105].

В отличие от ОСК, плотная система канальцев (ПСК) не имеет связи с плазматической мембраной тромбоцитов и является производной гладкого эндоплазматического ретикулума. Основной функцией ПСК является хранение внутриклеточного кальция, также играющего большую роль в процессах активации тромбоцитов [31].

Тромбоциты содержат большое количество секреторных везикул (пузырьков), диаметром от 200 до 600 нм; на гистологических препаратах эти везикулы имеют вид гранул, поэтому в литературе чаще всего используется термин “тромбоцитарные гранулы” или “гранулы тромбоцитов” [3]. В тромбоцитах выделяют 3 типа гранул:

Альфа-гранулы – содержат фактор IV тромбоцитов, бета-тромбоглобулин, тромбоспондин, фибронектин, фибриноген, фактор Виллебранда, различные ростовые факторы (VEGF, PDGF, EGF и др.), а также лизосомальные ферменты. Диаметр альфа-гранул – 300-500 нм;

Бета - гранулы (другое название – плотные гранулы) – содержат АДФ (неметаболический пул), ГДФ, серотонин и ионы кальция. Бета-гранулы несколько меньше альфа-гранул, их диаметр составляет 250-350 нм;

Гамма-гранулы (лизосомы) – содержат кислую фосфатазу, р-глюкуронидазу, катепсин и другие лизосомальные ферменты. Наиболее мелкие гранулы, их диаметр составляет 200-250 нм.

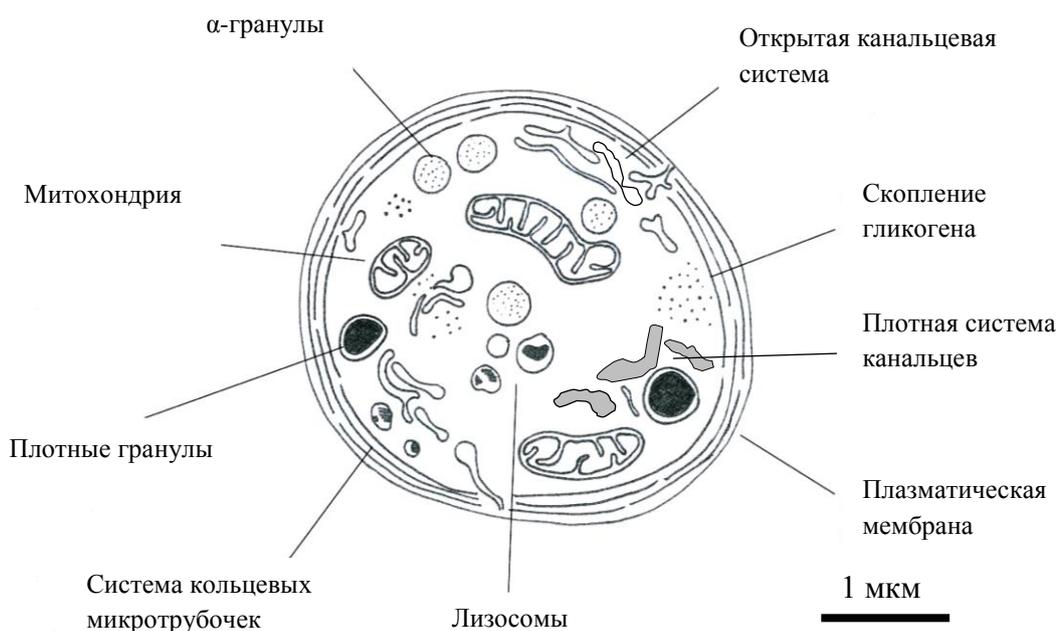


Рисунок 1. Схема строения тромбоцита (Быков В.Л. Частная гистология человека. СПб: Сотис, 1999. 301 с.)

Масс-спектрометрический анализ показал, что в тромбоцитах содержится более 700 типов белков, из которых на сегодняшний день идентифицированы около 200 [75,129]. Большая часть тромбоцитарных белков хранится в альфа-гранулах, плотных тельцах и лизосомах. Они поступают туда как в ходе мегакариоцитопоеза, так и путем включения из плазмы. В ходе активации тромбоцита происходит выбрасывание содержимого гранул наружу, после чего процесс активации становится необратимым[32,54,130]. Считается, что дегрануляция тромбоцитов является необходимым условием для их дальнейшей агрегации[6,31,89], поэтому нарушение функциональной активности тромбоцитов очень часто связано с отсутствием дегрануляции.

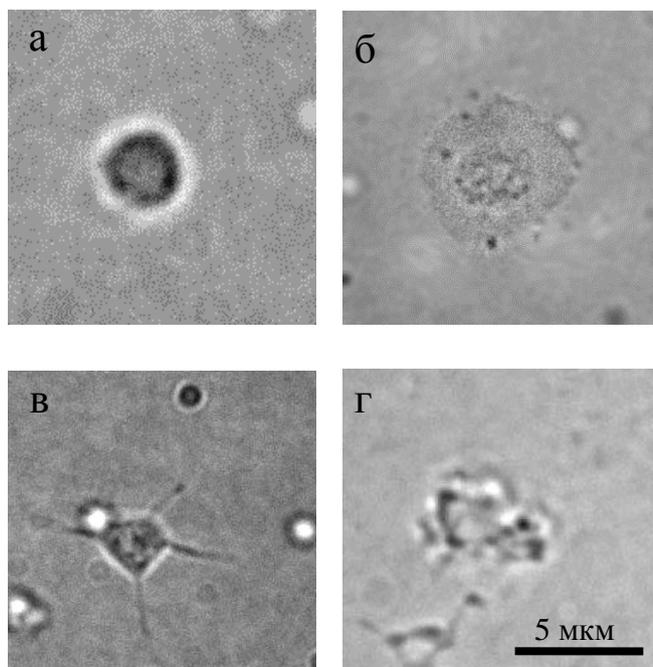
Отсутствие дегрануляции тромбоцитов может быть вызвано следующими факторами:

- Нарушения синтеза и/или накопления в гранулах тромбоцитов их содержимого. Эти нарушения ведут к расстройствам гемостаза и состояния эндотелия стенок сосудов [2,5,31,107];
- Расстройства механизма дегрануляции при взаимодействии тромбоцитов с агрегирующими факторами — АДФ, катехоламинами, тромбоксаном А<sub>2</sub>, коллагеном и др. [7,61,120]. Эти расстройства, как и нарушения синтеза и/или накопления в гранулах их компонентов, снижают контактную (адгезивную и агрегационную), а также прокоагулянтную активность тромбоцитов (способность инициировать процесс тромбообразования);
- Аномалии физико-химических свойств и/или химического состава и структуры мембран тромбоцитов. Чаще наблюдаются дефицит гликопротеинов, нарушения структуры и соотношения различных фракций мембранных фосфолипидов. Эти изменения также обуславливают нарушения адгезивной и агрегационной активности тромбоцитов [7,51,107].

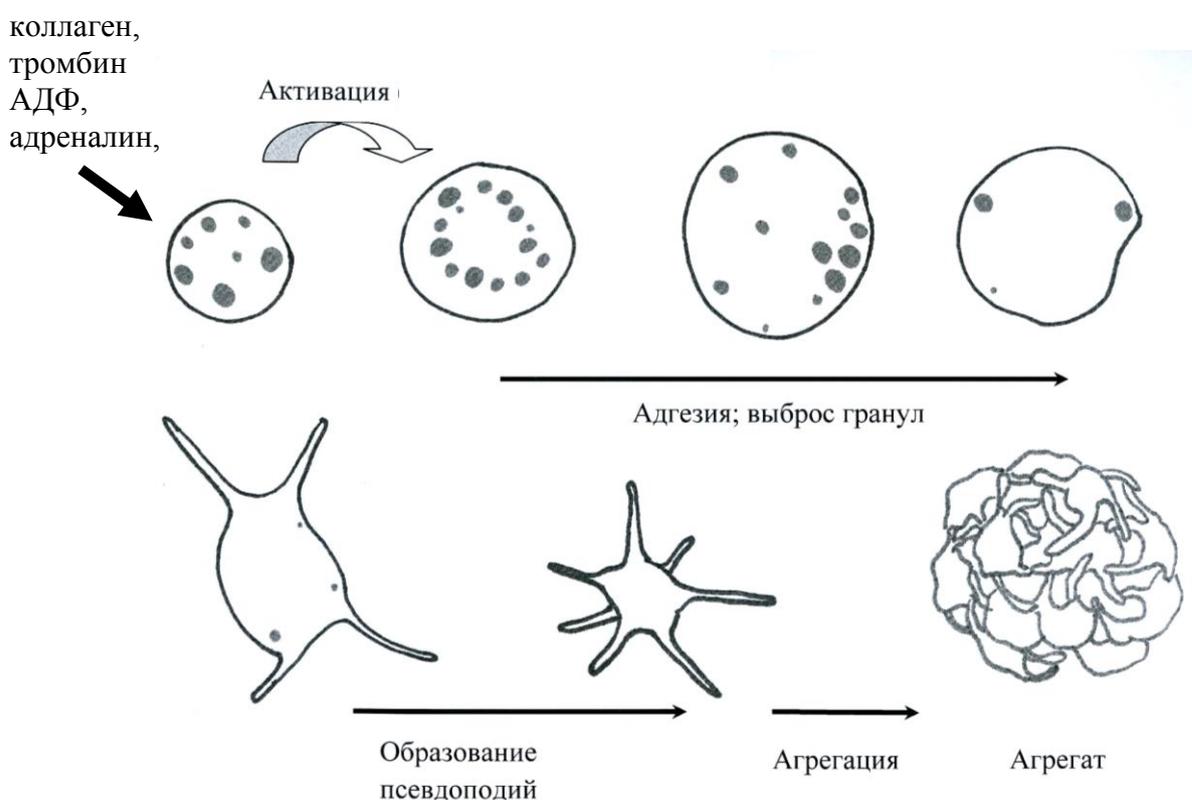
Отсутствие или дефект тромбоцитарных гранул является причиной целого ряда синдромов (тромбоцитопатий), связанных с нарушением гемостаза, чаще всего наследственных [5,8,31]. Вместе с тем, многократно показано, что некоторое количество тромбоцитов без гранул присутствуют в крови всех здоровых людей [18,25,29,54]. Этот эффект может частично объясняться наличием в циркулирующей крови тромбоцитов, находящихся на разной стадии активации. Выделяют несколько морфологических типов тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации.

Большая часть тромбоцитов периферической крови здоровых людей представлено дисковидными округлыми клетками [5,24,62]. Такие клетки также называют дискоцитами и идентифицируют как клетки «покоя» (1-й тип, рис. 2а). Ко 2-му типу тромбоцитов относят крупные клетки округлой формы с гладкой или складчатой поверхностью (рис. 2б). В литературе такие тромбоциты часто описываются как сферические, хотя на самом деле эти клетки имеют сильно уплощенную, “блинообразную” форму, что связано с их распластыванием на субстрате [64,66,67]. Считается, что тромбоциты 2-го типа находятся на ранней стадии активации и могут обратимо менять свою форму, становясь дискоцитами. Вместе с тем, отмечено, что доля тромбоцитов 2-го типа заметно повышается при различных патологических состояниях, в частности, после инфаркта миокарда и при диабете [91,118]. К 3-му типу относят тромбоциты, имеющие ярко выраженные отростки (отросчатые тромбоциты) и уже не содержащие гранул (рис 2в). Число визуально различимых отростков может достигать 10 на 1 тромбоцит. Выброс гранул за пределы тромбоцитов и образование ими отростков делает процесс активации необратимым, вследствие чего отросчатые тромбоциты часто называют “высоко активированными клетками” [24,99]; такие тромбоциты обладают локомоторной (двигательной) активностью и способны формировать тромбоцитарные агрегаты (рис. 3). К 4-му типу относят дегенеративные формы тромбоцитов, для которых характерны увеличенная площадь поверхности, неправильная форма и наличие больших вакуолей в цитоплазме (рис. 2г). Чаще всего, такие клетки не содержат гранул или содержат их в очень малом количестве.

Исходя из указанных характеристик, можно различить активированные и неактивированные тромбоциты, но возникает другой вопрос: как среди неактивированных тромбоцитов определить долю клеток с высокой и низкой функциональной активностью? Для решения этой задачи применяют различные методы морфометрического и функционального анализа тромбоцитов.



**Рисунок 2. Морфологические типы тромбоцитов в проходящем свете: а – дискоцит (1-й тип); б – большой округлый тромбоцит (2-й тип); в – отростчатый тромбоцит (3-й тип); г – дегенеративный тромбоцит (4-й тип)**



**Рисунок 3. Схематическое изображение морфологических изменений тромбоцита в ходе активации.**

## 1.2. МЕТОДЫ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ФИКСИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

Еще в 1948 году Т.В. Кенигсон разработала в качестве лабораторного метода характеристики популяции тромбоцитов так называемую тромбоцитарную формулу, основанную на морфометрическом анализе фиксированных тромбоцитов, окрашенных по Романовскому [цит. по 26]. Согласно данному методу, фиксированные и окрашенные тромбоциты принято разделять на “юные”, “зрелые”, “старые” и дегенеративные формы, исходя из морфологических различий. В “юных” тромбоцитах большую часть цитоплазмы занимает гиаломер, грануломер развит слабо и представлен очень мелкими гранулами, плохо различимыми в световом микроскопе. В “зрелых” клетках гиаломер и грануломер выявляются одинаково четко, тогда как в “старых” тромбоцитах грануломер занимает практически весь объем клетки. Дегенеративные тромбоциты описывают как клетки произвольной формы, в которых наблюдается нарушение структуры как гиаломера, так и грануломера. Кроме того, при различных патологиях выделяют т.н. вакуолизированные тромбоциты – крупные оксифильные клетки, содержащие 2 и более вакуолей. Считается, что подавляющее большинство тромбоцитов здоровых людей составляют “зрелые” формы (80-85%) и только 15-20% приходится на “юные” и “старые” тромбоциты, а также формы раздражения (отросчатые тромбоциты) и дегенеративные клетки, независимо от возраста человека [24-26]. Исходя из предложенной тромбоцитарной формулы следует, что все “зрелые” тромбоциты являются биологически полноценными клетками, а “юные” и “старые” – биологически неполноценными. Однако многократно показано, что функциональная активность тромбоцитов сильно варьирует в крови здоровых людей со сходной концентрацией тромбоцитов [42,80,93,97], т.е. суммарная активность пула тромбоцитов далеко не всегда зависит от содержания “зрелых” форм. Поэтому для характеристики качества тромбоцитов требуются более четкие морфометрические критерии.

К настоящему моменту существуют разные подходы к морфометрии фиксированных тромбоцитов [14,24-26,29,36], однако исследователи не достигли единого мнения о том, какие морфометрические параметры тромбоцитов следует считать приоритетными. Во многих работах в качестве наиболее наглядного и информативного морфометрического параметра рассматривают площадь тромбоцитов; считается, что этот параметр отражает размеры тромбоцитов, и свидетельствуют о разной степени их активности, а также об интенсивности тромбоцитопоза [36,99]. Помимо линейных размеров, некоторые исследователи предлагают учитывать цвето-яркостные характеристики фиксированных и окрашенных тромбоцитов, т.е. определять удельные оптические плотности по трем спектральным диапазонам (синем, зеленом и красном) и доли синего и красного цвета. Для количественного описания гиаломера и грануломера, оценивают удельные оптические плотности окрашенных клеток по красной и зеленой частям цветового спектра [26].

С другой стороны, гетерогенность тромбоцитов может быть обусловлена действием сугубо внешних факторов, связанных не с функциональным состоянием тромбоцита, а со способом получения препарата. Известно, что многие факторы (концентрация и тоничность фиксатора, температура, рН среды, время фиксации и др.) влияют на структуру тромбоцитов. Так, например, в мазке крови, фиксированной глутаровым альдегидом сразу после взятия, полиморфизм тромбоцитов практически не выявляется: как на световом, так и на электронно-микроскопическом уровнях, тромбоциты имеют форму, свойственную им в кровотоке, но при этом клетки разного размера имеют сходные физические параметры, такие как оптическая плотность, и др. [1,2,4,5,25]. В работе Ф.В. Коробовой показано, что промежуток времени между взятием крови и изготовлением мазка (т.е. фиксацией) существенно сказывается на морфологии тромбоцитов [26]. При отсрочке момента фиксации - либо за счет предварительного центрифугирования, либо при

высушивании на стекле, - наблюдается изменение формы и структуры пластинок, причем наиболее характерным является смещение гранул к центру и образование псевдоподий. В дальнейшем может происходить необратимый процесс выброса гранул тромбоцитов, который может сопровождаться слипанием пластинок друг с другом. При этом присутствие в пробе крови антикоагулянтов не препятствует изменению формы тромбоцитов, обратимой агрегации и реакции выброса [26]. Также необходимо учитывать субъективность исследователя и индивидуальные различия образцов крови (рН крови, вязкость и т.д.). В частности, наличие в мазке тромбоцитов без гранул (предположительно активированных тромбоцитов) зависит от реактивности кровяных пластинок того или иного человека (способности активироваться при взаимодействии с чужеродной поверхностью и друг с другом), а от также времени между взятием крови и изготовлением мазка [80].

Более детальный анализ морфологии и внутреннего состава фиксированных тромбоцитов возможен с помощью методов электронной и атомно-силовой микроскопии [7,14,66], в частности, в работе M.G. Egidi et al замечательно показаны стадии изменения формы тромбоцитов в ходе активации [66]. Однако, как и в случае световой микроскопии, электронная микроскопия не позволяют оценить функциональную активность отдельно взятого тромбоцита, а также оценить соотношение функционально активных и неактивных тромбоцитов в пробе. Более того, методы электронной и атомно-силовой микроскопии отличает высокая стоимость оборудования, трудоемкость и длительность подготовки образцов, что также препятствуют активному использованию метода в области клинической диагностики [43,46]. Таким образом, исследование тромбоцитов на фиксированных препаратах не позволяет достоверно оценить общее морфофункциональное состояние популяции тромбоцитов. По всей видимости, именно поэтому до сих пор не существует критериев и программных алгоритмов, которые позволяли бы

определить понятие «морфологической нормы» тромбоцита периферической крови [5,26,36,51]. Во многом это обусловлено высокой морфологической гетерогенностью тромбоцитов, поскольку эти клетки заметно различаются в размере, плотности, метаболических, функциональных и биохимических свойствах даже в пределах одного и того же организма [99].

### **1.3. МЕТОДЫ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ НЕФИКСИРОВАННЫХ ТРОМБОЦИТОВ**

#### **1.3.1. Методы агрегометрии**

На сегодняшний день функциональную активность тромбоцитов чаще всего оценивают с помощью различных типов агрегометров. Агрегометр - аппарат, определяющий интенсивность агрегации тромбоцитов в нефиксированной плазме или цельной крови. Принцип действия агрегометра заключается в следующем: под действием активирующих факторов (коллаген, АДФ, ристоцетин и др.) в плазме происходит индуцированная агрегация тромбоцитов, в результате чего физические свойства плазмы изменяются. Эти изменения фиксируются прибором и затем выдаются в аналоговой или цифровой форме. На основе этих данных оценивают агрегационную активность пула тромбоцитов [29,45,71,131].

Для лечебно-диагностических целей чаще всего используют оптические агрегометры и импедансные агрегометры. Оптические агрегометры фиксируют изменения оптической плотности плазмы в ходе агрегации; импедансные агрегометры измеряют изменение сопротивления (импеданса) и других электрических параметров при прохождении микротоков в специальном электродном блоке, погруженном в различные образцы – в цельную кровь, плазму обогащенную тромбоцитами, разведенную кровь или во взвесь отмывых тромбоцитов. В импедансном агрегометре первоначальный контакт электродов с образцом приводит к образованию на них монослоя

тромбоцитов. Затем при добавлении активирующих агентов (коллаген, АДФ и др.) происходит постепенная агрегация тромбоцитов на электродах, которая и приводит к характерным изменениям электрических свойств системы. Считается, что увеличение импеданса прямо пропорционально тромбоцитарной массе, осажденной на специальный электродный блок, т.о. кинетика импеданса позволяет количественно судить о кинетике процесса агрегации. Методом электронного импеданса можно проводить измерения агрегации даже там, где оптическая агрегация это сделать не может - в гемолизированных, иктероичных и липемичных образцах [29,131].

Вместе с тем, способ оценки функциональной активности тромбоцитов с помощью агрегометрии имеет следующие недостатки:

- невозможность оценки содержания тромбоцитов с высокой и низкой функциональной активностью (биологически полноценных и неполноценных клеток);
- невозможность анализа тромбоцитов при различных заболеваниях, связанных с нарушением или изменением структуры рецепторов, связывающих индукторы активации;
- невозможность анализа агрегационной активности тромбоцитов в бесплазменной среде
- возможность работы прибора лишь при определенном диапазоне концентраций тромбоцитов в пробе;
- невозможность оценки агрегационной активности тромбоцитов в малом объеме пробы (минимальный объем крови/плазмы, необходимый для анализа с помощью агрегометра -450-500 мкл)
- сложность выбора подходящих индукторов активации;

Таким образом, методы агрегометрии дают лишь общую характеристику функциональной активности всей популяции тромбоцитов без оценки содержания функционально пригодных клеток и их структурной целостности.

### **1.3.2. Методы проточной цитометрии**

Основное преимущество проточных систем – их высокая скорость измерения характеристик клеток – связано с "аналоговым" принципом работы прибора, когда с высокой скоростью измеряются заданные оптические и кондуктометрические параметры клеток [19,90,124]. Проточные автоматические гематологические анализаторы имеют встроенную жесткую высокостабильную систему анализа и приготовления клеточных суспензий, что обеспечивает высокую чувствительность измерений и воспроизводимость результатов анализа. Большой объем выборки (до 500 тыс. клеток) дает возможность существенно повысить точность измерений, что в любом случае улучшает надежность результатов и снижает статистическую погрешность. Особенно большое значение это имеет для решения задач, связанных с классификацией клеток (в частности анализ лейкоформулы крови) [29].

Вместе с тем, возникает ряд методологических затруднений при оценке качества тромбоцитов методом проточной цитометрии. Данные, полученные на основании исследования морфологии неокрашенных тромбоцитов, не могут быть использованы для адекватной оценки качества тромбоцитов, поскольку, во-первых, популяция тромбоцитов обладает высокой гетерогенностью как по размерам, так и по внутренней структуре, во-вторых, до сих пор не сформулировано понятия "морфологической нормы" для тромбоцитов. Исходя из этого, цитометрические исследования тромбоцитов чаще всего проводят с использованием специальных флуоресцентных красителей.

Существует широкий набор флуоресцентных зондов для тромбоцитов, представленных в виде антител, связанных с флуорохромами, или в виде

отдельных флуорохромов. Флуоресцентные зонды используются для выявления различных рецепторов и маркеров активации тромбоцитов [61,64,83,118]; для выявления “юных” форм тромбоцитов, содержащих фрагменты ядер (тиазоловый оранжевый, бромистый этидий)[19,63,124]; для определения содержания мертвых клеток (пропидий йодид, аннексин V) [88,90,109]. Однако отсутствие визуального контроля в проточной цитометрии может приводить к затруднениям в интерпретации результатов анализа, а также не позволяет определить содержание в популяции функционально пригодных и непригодных клеток. Следовательно, методы проточной цитометрии также не позволяют адекватно оценить морфофункциональный статус тромбоцитов.

### **1.3.3. Морфофункциональная оценка тромбоцитов с помощью фазово-интерференционной микроскопии**

Наиболее близким к решению проблемы морфофункционального анализа нефиксированных тромбоцитов является метод морфометрического прижизненного исследования тромбоцитов с помощью фазово-интерференционной микроскопии [4,24]. Предлагаемый метод основан на том, что из крови с помощью центрифугирования выделяют плазму, богатую тромбоцитами, а затем проводят морфометрический анализ нефиксированных тромбоцитов с помощью фазово-интерференционного микроскопа “Цитоскан”. Комплексный алгоритм морфометрии обеспечивает автоматическое определение заданных размерных параметров отдельных клеток (диаметр, периметр, высота, площадь, объем), подсчет процента активированных тромбоцитов, статистическую обработку данных на популяционном уровне и документирование результатов в виде цитограмм. На основе полученных данных всю популяцию тромбоцитов разделяют на 4 группы: дисковидные тромбоциты (неактивированные), большие округлые тромбоциты с 1-3 короткими отростками (тромбоциты ранней стадии активации), сферические тромбоциты с 2-5 длинными отростками

(активированные тромбоциты) и тромбоциты неправильной формы (дегенеративные). По соотношению численности клеток всех 4-х групп делается общий вывод о качестве всей популяции тромбоцитов.

К недостаткам данного метода можно отнести отсутствие реального анализа функций исследуемых тромбоцитов; невозможность выявить среди дисковидных тромбоцитов клетки с высокой и низкой функциональной активностью; невозможность оценить целостность внутреннего состава исследуемых тромбоцитов; необходимость получения плазмы, богатой тромбоцитами; использование дорогостоящей микроскопической аппаратуры, существующей в единичном экземпляре. По всей видимости, все же основным недостатком предложенного метода прижизненного исследования тромбоцитов является невозможность реально оценить функциональную активность тромбоцитов. Поэтому для адекватной оценки морфофункционального статуса тромбоцита требуется проведение параллельной оценки целостности структуры тромбоцита и его функций.

В клеточной биологии эта проблема решается путем использования витальных красителей, которые позволяют дифференциально выявить отдельные структурные компоненты клеток без нарушения их жизнедеятельности [40,41,56]. Витальное окрашивание клеток позволяет оценить различные формы клеточной активности – пролиферативную, секреторную, локомоторную [101] – а также целостность их внутреннего состава, что позволяет оценить морфофункциональный статус исследуемых клеток. Однако до сих пор не существовало метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью витального окрашивания, следовательно, разработка такого метода представляется актуальной задачей.

## **1.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ДЛЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

### **1.4.1. Использование витальных красителей в клеточной биологии**

**Витальные (прижизненные) красители** – “красители, обладающие минимальной токсичностью, которые используются для выявления различных органелл и анализа их изменений в процессе жизнедеятельности клетки, а также для изучения различных физиологических явлений, происходящих в клетке” [41]. Первые витальные цитологические красители появились еще в конце XIX - начале XX века и были основаны на введении в организм или культуру клеток малотоксичных красящих веществ, разведенным физиологическим буфером [40,41]. Первоначально в этом качестве использовали 1-2% раствор туши на физиологическом буфере, с помощью которой изучали фагоцитарную активность клеток, а также их способность к выведению чужеродных агентов [40]. Сходным образом действуют красители, приготовленные на основе гистологических красок – трипановый синий, нейтральный красный, литиевый кармин [40,47,49]. С их помощью можно отличить живые клетки от мертвых: в живых клетках эти красители накапливаются в эндосомах и лизосомах (для трипанового синего характерно окрашивание терминальных районов аппарата Гольджи), в то время как мертвые клетки окрашиваются диффузно (равномерно), без какой-либо дифференциации [21,40]. Похожим действием обладают флуорохромные красители из группы родаминов, красителей ксантеинового ряда. Родамин обладает повышенным сродством с гидрофобными (липидными) структурами, поэтому в 30-50-е годы родамины часто использовали для окраски растительных и животных клеток [40]. В настоящее время активно применяется смесь аурамин-родамин С для бактериологических тестов [77]; однако в большинстве случаев родамины не используют в качестве самостоятельных красителей и применяют главным образом в качестве флуоресцентных зондов, связанных с антителами [9,56,59,77].

Одним из главных требований к витальным красителям является их высокая избирательность при окрашивании. В настоящее время для витальной окраски определенных клеточных структур чаще всего используют т.н. митотрекеры (MitoTrackers) – специфические зонды, связанные с флуорохромами. Структура этих зондов такова, что они могут взаимодействовать с внутренними компонентами клеточных органелл без нарушения их внутренней структуры, позволяя наблюдать органеллы в нефиксированных клетках в течение длительного времени [9,94]. Набор митотрекеров весьма велик – существуют специфические красители для выявления цистерн гранулярного ЭПР, аппарата Гольджи, лизосом, митохондрий и т.д.[116]. В зависимости от целостности органеллы свечение митотрекера будет более или менее интенсивным - например, прижизненный маркер митохондрий родамин 123 окрашивает только митохондрии с высоким трансмембранным потенциалом (функционально активные митохондрии); при нарушении структуры митохондрий или снижении их функциональной активности свечение родамина 123 исчезает [87]. Существующие биофизические методы анализа флуоресцирующих клеток (FRAP, STED), а также методы видеомикросъемки позволяют автоматически оценить миграцию флуоресцентной метки *in vivo* внутри клеток [1,94,98,101,105,110]. Такой подход позволяет оценить динамическую изменчивость клеточных мембран, интенсивность работы вакуолярной системы, процессы внутриклеточного транспорта и энергообразования [87,101,127]. Поэтому применение митотрекеров особенно эффективно при исследовании культивируемых клеток. Пожалуй, единственным ограничением использования митотрекеров здесь является их высокая стоимость.

Другим популярным направлением анализа прижизненной флуоресценции клеток является исследование трансгенных животных и клеточных культур, содержащих гены флуоресцирующего белка GFP (green fluorescence protein) в разных модификациях [119]. Клетки, экспрессирующие ген GFP, под действием возбуждающего света способны флуоресцировать

безо всякого дополнительного окрашивания. В результате появляется возможность морфофункционального анализа клеток внутри целых организмов на разных стадиях эмбриогенеза, а также взрослых форм [101,119]. Кроме того, введение в клеточный геном структур, кодирующих GFP-белок, позволяет добиться прижизненной флуоресценции мелких высокодифференцированных клеток с уникальным строением или с малым набором органелл (нефотосинтезирующие бактерии, одноклеточные водоросли, клетки беспозвоночных).

Однако в тромбоцитах человека большинство органелл, характерных для эукариотических клеток либо отсутствует (ядро, аппарат Гольджи), либо развито слабо (митохондрии, цистерны ЭПР), а элементы цитоскелета окрасить витальными красителями очень трудно. В результате выбор витального флуорохромного красителя для тромбоцитов представляет определенную проблему.

#### **1.4.2. Исследование клеточных компонентов крови с помощью витальных красителей.**

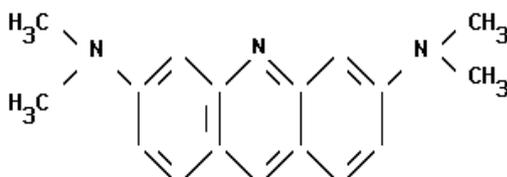
В литературе применение витальных красителей для исследования клеток крови описано достаточно узко [113,116]; во многом это связано с тем, что почти все современные методы микроскопического исследования клеток крови основаны на изучении фиксированных препаратов. Существуют отдельные работы, в которых нефиксированные тромбоциты человека витально окрашивали митотрекерами, имеющими сродство с митохондриями и элементами ПСК [122]; в этих работах определяли интенсивность флуоресценции тромбоцитарных митохондрий и ПСК, на основе которой оценивали биологическую полноценность исследуемых тромбоцитов. Однако полученные в них данные указывали на то, что порядка 92-97% всей популяции тромбоцитов человека представлено биологически полноценными клетками, причем это число не имеет тенденции к понижению в ходе хранения тромбоцитов, что явно не соответствует многочисленным наблюдениям.

Следовательно, такой метод окрашивания тромбоцитов является неэффективным.

С другой стороны, были основания предполагать, что эффективного витального окрашивания тромбоцитов человека можно добиться с помощью красителей акридинового ряда. Наиболее известным акридиновым красителем, использовавшимся для витального окрашивания клеток крови, является флуорохром акридиновый оранжевый (3,6-бис-диметиламиноакридин гидрохлорид). Характерной особенностью акридинового оранжевого (АО) является его способность существовать в растворе как в мономерной, так и в димерной форме с соответствующими максимумами флуоресценции в области 530 нм и 640 нм. Мономер красителя (рис. 4) связывается с двуспиральными нуклеиновыми кислотами (максимум флуоресценции 530 нм), а димер - с односпиральными (максимум флуоресценции 640 нм). Это позволяет на одном и том же препарате дифференциально выявить ДНК- и РНК-компоненты, которые при окрашивании АО имеют зеленое и красно-оранжевое свечение [23]. Метахроматичность флуоресценции акридинового оранжевого была обнаружена еще в 1930-е годы Ф. Букачем и М. Хайтингером, а также С. Штруггером [40,49]. Тогда же было показано, что при окрашивании АО нефиксированных препаратов ядра живых клеток имеют зеленое свечение, ядра мертвых – медно-красное. С тех пор АО широко использовался в клеточной биологии для выявления нуклеиновых кислот прокариот и эукариот [20,21,132]; однако, уже в 50-е годы появляются данные о способности АО к окрашиванию некоторых цитоплазматических компонентов [21,40,98]. Позднее было показано повышенное сродство АО с лизосомами и поздними эндосомами эукариотических клеток, при этом цвет и интенсивность свечения этих органелл напрямую зависит от их структурной целостности и функциональной активности [20,48].

Начиная с 1960-х годов, АО используется для окраски нефиксированных ядродержащих клеток крови [18,40,41], а также для выявления

ретикулоцитов [40]; в 1970-е годы лимфоциты, окрашенные АО, использовались в молекулярной биологии как модель для количественного анализа ДНК и РНК в зависимости от степени активности хроматина [24,74,85]. В настоящее время на примере культуры лимфоцитов, окрашенных АО, исследуют структуру митотических хромосом [77,132].



**Рисунок 4. Структура акридинового оранжевого**

Как известно, в норме тромбоциты не содержат ДНК-компонентов (исключая кольцевой геном немногочисленных митохондрий), однако в ряде работ АО используется для работы с тромбоцитами. Так, например, В.К. Козловым описана способность тромбоцитов накапливать АО в альфа-гранулах, что позволяет видеть флуоресценцию этих гранул методом проточной флуориметрии [23,84]. После активации тромбоцитов тромбином в присутствии  $Ca^{2+}$  флуоресценция гранул исчезает, а при действии блокатора активации (аминазина) – сохраняется [84]. Недостаток этого, безусловно, очень ценного наблюдения заключается в том, что все исследования проводились на проточном флуориметре и не было произведено детального анализа морфологии тромбоцитов. По всей видимости, это было вызвано невозможностью распознать отдельные тромбоциты, окрашенные только АО. Помимо альфа-гранул, АО обладает способностью накапливаться в плотных гранулах, содержащих серотонин [100,102]. Считается, что такое избирательное накопление обусловлено пониженным рН в альфа-гранулах и плотных тельцах, что вызывает повышенное сродство АО с этими структурами тромбоцитов [72,94]. Следовательно, АО может быть использован для выявления альфа-гранул и плотных телец в тромбоцитах.

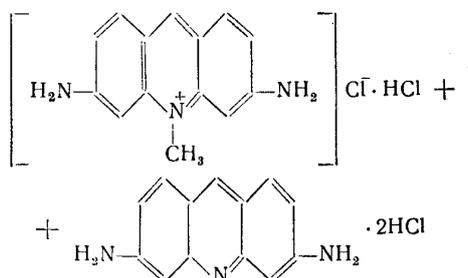
В других исследованиях АО используется в качестве внеклеточного флуоресцирующего зонда, с помощью которого предлагается оценивать интенсивность эндоцитоза тромбоцитов [47]. Эндоцитозная активность тромбоцитов описана [31,120,126]; более того, есть данные о способности тромбоцитов к уничтожению опухолевых клеток [73,97]; однако вряд ли эти функции являются определяющими в оценке жизнеспособности тромбоцитов. Кроме того, сама структура красителя АО указывает на то, что этот краситель способен свободно проникать в живые клетки независимо от уровня их эндоцитозной активности [48,132].

Был сделан вывод о пригодности АО для витального окрашивания гранул тромбоцитов. С другой стороны, этот краситель также окрашивает цитоплазму в тот же цвет, что и гранулы, в результате чего в витально окрашенных АО тромбоцитах часто не удается выявить гранулы отдельно от цитоплазмы [18]. Поэтому, для витальной окраски тромбоцитов необходим еще один краситель, позволяющий дифференциально окрасить цитоплазму клеток. Среди витальных красителей, позволяющих окрасить цитоплазматические компоненты клеток наиболее эффективными представляются следующие:

**Родамин С** (3,6 – бис(диэтиламино)-9(2-карбоксифенил)ксантин) – краситель ксантеинового ряда, под действием возбуждающего зеленого цвета (λвозбуждения 510-540нм) дает красное свечение. Родамин С может быть использован для витального окрашивания нейтральных растительных жиров[49], митохондрий и цитоплазмы растительных и животных клеток [40], активно связывается с мембранными компонентами клетки[77], нетоксичен.

**Нейтральный красный** (3-Амино-6-диметиламино-2 метилфеназоний), в проходящем свете витально окрашивает ядерные и цитоплазматические компоненты клеток в красный цвет [30,41]. Может быть использован для исследования эндоцитозной и экзоцитозной активности эукариотических клеток.

**Трипафлавин** (3-6-диамино-10-метил-акридин-хлорид) – флавиновый краситель акридинового ряда (рис. 5), под действием возбуждающего синего цвета (λвозбуждения 450-490нм) дает зеленое свечение.



**Рисунок 5. Структура трипафлавина**

До 1960-х годов трипафлавин широко использовали в клеточной биологии для окраски ядер [41], однако затем интерес к трипафлавину как к красителю резко упал. В литературе 1950-х годов описывается использование трипафлавина для окрашивания нейтрофилов клеток [41]; в настоящее время трипафлавин не используют. Также как и АО, трипафлавин можно использовать для прижизненной окраски ядер, однако при окраске клеток трипафлавином наблюдается также и флуоресценция цитоплазмы [40,41,81]. Кроме того, показано повышенное сродство трипафлавина с глией и мышечной тканью [58] при различных патологиях, связанных с накоплением в клетках нейтральных липидов [81]. Таким образом, трипафлавин способен связываться с нейтральными липидами биологических мембран. Это свойство трипафлавина весьма замечательно, поскольку оно позволяет использовать трипафлавин для прижизненного окрашивания цитоплазмы клеток.

Вышеперечисленные данные указывают на возможность разработки метода витального окрашивания тромбоцитов, позволяющего получать дифференциальное свечение цитоплазмы и гранул этих клеток, и разработки метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью витального окрашивания, позволяющего проводить анализ структурной целостности и активности этих клеток.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все исследования проведены на базе НИИ СП Н.В.Склифосовского.

### 2.1. ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе разработки способа оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания были проведены следующие серии экспериментов (табл. 1):

Таблица 1

Серии экспериментов по разработке способа оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека

Цель экспериментов	Количество серий экспериментов
Выбор витальных красителей для дифференциального окрашивания тромбоцитов человека	30
Сравнение функциональной активности окрашенных и неокрашенных тромбоцитов	50
Исследование жизнеспособности витально окрашенных тромбоцитов	20
Оценка популяции витально окрашенных тромбоцитов с помощью проточной цитометрии	20
Сравнение морфофункциональных параметров тромбоцитов с их функциональной активностью	100
Оценка рост-стимулирующего действия PDGF тромбоцитов	12
Оценка влияния ДМСО на клеточные мембраны различных субпопуляций тромбоцитов.	50
Оценка степени агрегации тромбоцитов под действием разных индукторов	50

Для оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека исследовали образцы консервированной крови (СРД 1:7) и богатой тромбоцитами плазмы (БТП) 300 доноров крови; 50 концентратов тромбоцитов (КТ), полученных с помощью аппаратного афереза у доноров тромбоцитов (афКТ) и 50 пулированных КТ из ЛТС доноров крови (пулКТ); 15 доноров органов.

Апробация метода проведена у 340 больных следующих групп:

1. 50 пациентов с острыми экзогенными отравлениями;
2. 40 пациентов с изолированными переломами костей нижних конечностей;
3. 20 пациентов с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии;
4. 10 реципиентов почки на 21 сутки после трансплантации;
5. 20 пациентов с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери и тех же пациентов непосредственно после проведения им целенаправленной трансфузионной терапии;
6. 50 больных ишемической болезнью сердца (ИБС) и 50 – с пороками клапанов сердца на стадиях до оперативного вмешательства и через 2 часа после оперативного вмешательства;
7. 30 больных с острым коронарным синдромом (ОКС) на фоне ИБС;
8. 10 больных с ОКС на фоне ИБС на разных стадиях действия антиагреганта клопидогреля (до назначения препарата, через 6 часов после приема нагрузочной дозы 600 мг, через 24 часа и на 7-е сутки на фоне приема поддерживающей дозы 75 мг в сут);

9. 100 гематологических больных острым миелоидным лейкозом, из них 60 больных без геморрагического синдрома (ГС) и 40 – с тромбоцитопеническим ГС II-III степени;
10. 10 больных с тромбозами вен печени.

Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали на центрифуге Allegra 64R (Beckman Coulter, США) со скоростью 1200/мин в течение 5 мин, после чего отбирали надосадок. Аферезные КТ получали у доноров тромбоцитов с помощью аппарата Cobe Trima, пулированные КТ – из лейкоцитарных слоев цельной крови 4-6 доноров путем мягкого центрифугирования [43]. Объем каждого афКТ составлял 100-120 мл, пулКТ – 20-30 мл. Образцы КТ хранили при комнатной температуре (20-22°C) на горизонтальном шейкере в течение 5 суток. Морфофункциональный анализ тромбоцитов КТ проводили с интервалом в 1 сутки. Кроме того, исследовали 30 образцов афКТ и пулКТ в процессе криоконсервирования с 5% ДМСО при -84°C в течение 7-10 суток. Морфофункциональный анализ таких КТ проводили до и после криоконсервирования.

## **2.2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ КРАСИТЕЛЯ**

Для прижизненной окраски тромбоцитов использовали смесь 2-х флуорохромов – трипафлавина и акридинового оранжевого на 0,15М фосфатном буфере Зеренсена (рН=7.3, близкий к рН крови). Для получения 100 мл 0,15М буфера Зеренсена (рН=7.3) смешивают 23 мл 0,15М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (18,38г в 1000 мл дист  $\text{H}_2\text{O}$ ) и 77 мл 0,15М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (18,92г в 1000 мл дист  $\text{H}_2\text{O}$ ). Приготовление красителя состоит из двух этапов. На первом этапе готовят концентрированные растворы трипафлавина (раствор А) и акридинового оранжевого (Раствор Б). Раствор А – трипафлавин разводят 0.15М буфером Зеренсена в соотношении 1:2000. Необходимо добиться полного растворения кристаллов трипафлавина. Раствор Б – акридиновый

оранжевый разводят 0.15М буфером Зеренсена в соотношении 1:1500. Затем оба раствора смешивают в соотношении 1:1.

Прижизненную окраску тромбоцитов можно проводить как в пробирке, так и на предметном стекле. Для окрашивания в пробирке плазму и красители смешивают в соотношении 2:1 и окрашивают в течение 10 минут. Затем пипеткой отбирают 10-15 мл смеси, переносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Исследовать прижизненно окрашенные тромбоциты можно и в капле, и в мазке.

При окрашивании на предметном стекле сначала отбирают 10-12 мкл плазмы и переносят на покровное стекло. Затем в каплю вносят 5-7 мкл готового красителя и окрашивают в течение 5-10 мин. После этого каплю накрывают покровным стеклом и переносят к микроскопу.

### **2.3. МИКРОСКОПИЯ**

В работе использовали микроскоп “Nicon Eclipse 80i” (фирма “Nicon”, США) со встроенной флуоресцентной насадкой “Nicon D-eclipse C1si”(фирма “Nicon”, США). Препараты рассматривали под объективом x100, числовая апертура 1.25. Для получения флуоресцентного изображения использовали светофильтр (λвозбуждения 450-490нм, λэмиссии – от 520нм). Полученные изображения фотографировали с помощью цифровой фотокамеры “Nicon”(“Nicon”, США) при экспозиции 0.25-0.5 сек. Для морфометрического исследования тромбоцитов использовали программу Adobe Photoshop 7.

В ходе морфофункционального анализа определяли следующие параметры тромбоцитов: концентрацию тромбоцитов с гранулами, Стр.(тыс/мкл); относительное содержание тромбоцитов с гранулами, Дтр.гр.(%); концентрацию тромбоцитов с гранулами, Стр.гр.(тыс/мкл); морфофункциональную активность, МФАТ (в фут-канделах или баллах); адгезивную активность, ААТ (в % или баллах); морфофункциональный статус

тромбоцитов, МФСТ (в баллах). Подробное описание этих параметров изложено в главе 3.

## **2.4. ЦИТОМЕТРИЯ**

Подсчет общей концентрации тромбоцитов осуществляли с помощью гематологического анализатора AcTdiff2 (фирма “Beckman Coulter”, США). Анализ содержания витально окрашенных тромбоцитов и их разделение в автоматическом режиме проводили на цитометрическом сепараторе клеток MoFlo XDP. При исследовании использовались гистограммы распределения сигналов с прямым и боковым светорассеиванием, интенсивности флуоресценции в каналах с длинами волн 525 нм и 650 нм. Количество частиц, накапливаемое в исследованиях, составляло 500000. Основой для оценки структуры популяции витально окрашенных тромбоцитов являлась гистограмма соотношения интенсивности флуоресценции по каналам FL1/FL4 в логарифмическом масштабе. Получаемые данные распределения сигналов по каждому из каналов классифицировались по степени интенсивности флуоресценции как низкая и высокая. На основании данных о структуре популяции витально окрашенных тромбоцитов проводили разделение клеток по интенсивности флуоресценции. После сепарации проводили морфологический анализ клеток с помощью флуоресцентного микроскопа.

## **2.5. ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ**

Исследования агрегационной активности тромбоцитов проводили с помощью импедансного агрегометра 591 (Chrono-Log, США) и оптического агрегометра 470VS (Chrono-Log, США). В качестве индуктора агрегации использовали 2мкг/мл коллагена или 5мкМ/мл АДФ. Оценку агрегационной активности тромбоцитов проводили в цельной крови (индуктор - коллаген) и БоТП (индуктор - АДФ) в течение 5 минут. В результате на экране компьютера появляется график с кривой, характеризующей динамику

изменения сопротивления среды в ходе активации тромбоцитов. Программа автоматически выдает следующие данные: амплитуда (максимальное отклонение сопротивления), угол наклона кривой, время задержки (lag-период) и площадь под кривой. Агрегационную активность тромбоцитов оценивают в Ом\*мин (импедансный метод) или % (оптический метод).

## **2.6. ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ТРОМБОЦИТОВ**

Проведено 10 серий экспериментов по оценке влияния витально окрашенных тромбоцитов на пролиферативную активность клеток человека. Для получения сыворотки кровь вносили в сухую пробирку без антикоагулянта и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин, после чего отбирали надосады. Для получения плазмы кровь вносили в пробирку с цитратом и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. Концентрацию PDGF определяли в плазме и в сыворотке крови с помощью набора реагентов «Qantikine, Human PDGF-BB Immunoassay» фирмы «R & D Systems» и системы «Multiskan ascent» фирмы «Thermo». Для морфофункционального анализа тромбоцитов неразделенной крови были выбраны параметры Стр.гр. и МФАТ.

Исследование влияния PDGF сыворотки на пролиферативную активность клеток проводили на культуре фибробластов человека линии М-22. Клетки выращивали в среде ДМЕМ с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, Россия) на 6-ти луночных планшетах фирмы «Costar» при 37°C и концентрации CO<sub>2</sub> 5%. В лунки опыта добавляли сыворотки крови доноров с известным содержанием PDGF (от 20 до 300 пг на 1 лунку). Для стерилизации сывороток применяли фильтр «Millipore» (диаметр пор -200 нм). Общее количество клеток в культуре (тыс. на 1 лунку), индекс пролиферативной активности на 3-и сутки культивирования - ИП<sub>3</sub>(определяется как отношение количества клеток в лунке на 3-и сутки культивирования к количеству клеток на 1-е сутки культивирования) и

целостность клеточных мембран (ЦКМ, в баллах) определяли с помощью метода морфофункциональной оценки клеточного компонента биотрансплантатов (Патент №2484472 С1 МПК G01N33/48, авторы Макаров М.С., Хватов В.Б., Конюшко О.И., Боровкова Н.В., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. 10.06.2013), основанного на окрашивании мембран исследуемых клеток с помощью витальных флуорохромных красителей трипафлавина и родамина С.

## **2.7. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ.**

Полученные данные были обработаны с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ «Microsoft Excel 2000» и STATISTICA 6.0. Вычисляли средние арифметические значения ( $M$ ), среднеквадратичные отклонения ( $\sigma$ ), уравнения регрессионной зависимости, коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $G$ ). Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95% ( $p < 0,05$ ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Глава 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА.**

Обоснованием к разработке метода витального окрашивания тромбоцитов послужили данные научной литературы о флуоресцентных красителях, способных окрашивать гранулы и мембранные компоненты нефиксированных клеток. При этом регистрация свечения тромбоцитов с помощью методов цитометрии позволит проводить количественную характеристику исследуемых клеток.

#### **3.1. Выбор витальных красителей для дифференциального окрашивания тромбоцитов человека.**

Витальное окрашивание тромбоцитов должно отчетливо выявлять тромбоцитарные гранулы на фоне остальной цитоплазмы без потери тромбоцитами их основных функций. Поэтому необходимо было выбрать красители, позволяющие окрашивать гранулы и цитоплазмы тромбоцитов в разные цвета. Так, акридиновый оранжевый (АО) обладает способностью накапливаться в альфа - гранулах и плотных гранулах тромбоцитов, а также в лизосомах многих эукариотических клеток. Однако АО не позволяет отчетливо различать тромбоцитарные гранулы на фоне остальной цитоплазмы. Для дифференциальной окраски цитоплазмы тромбоцитов были выбраны красители трипафлавин, родамин С и нейтральный красный в комбинации с АО.

Проведено 30 серий экспериментов, в которых тромбоциты крови человека окрашивали вышеперечисленными красителями в разных комбинациях. Установлено, что окрашивание клеток смесью трипафлавина и АО вызывает в тромбоцитах зеленое свечение цитоплазмы и красное свечение гранул, отчетливо различимое во флуоресцентном микроскопе (рис. 6а). Следовательно, смесь трипафлавина-АО позволяет проводить

дифференциальную окраску тромбоцитов человека. Отметим, что окраска тромбоцитов только с помощью АО или трипафлавина не позволяет добиться дифференциальной окраски клеток (рис. 6б). Также не удастся получить дифференциальную окраску клеток при использовании родамина С как в комплексе с АО, так и без АО. Родамин С гомогенно окрашивает всю цитоплазму тромбоцитов, что не позволяет отчетливо выявить тромбоцитарные гранулы (рис. 6в). При использовании нейтрального красного окрашивает все элементы вакуолярной системы тромбоцитов и митохондрии окрашиваются одновременно. Это затрудняет выявление гранул; кроме того, этот краситель не позволяет четко определить границы окрашенных клеток (рис. 6г). Таким образом, смесь трипафлавина и АО выбрана для окрашивания тромбоцитов.

Отметим, что оптимальное соотношение трипафлавина и АО в готовом красителе составило 1:1 (рис.7б). При таком соотношении красителей окрашивание тромбоцитов позволяет отчетливо выявить границы отдельных клеток, а также гранулы в их составе. При других соотношениях трипафлавина и АО (2:1, 5:1, 1:2 и т.д.) гранулы в составе тромбоцитов выявляются хуже или не выявляются вообще (рис. 7а, в).

### **3.2. Анализ функциональной активности витально окрашенных тромбоцитов**

Проведено 50 серий экспериментов по анализу функциональной активности неокрашенных и окрашенных тромбоцитов крови 100 доноров. Индуцированная коллагеном или АДФ агрегационная активность тромбоцитов составляла соответственно  $62,4 \pm 7,7$  (Ом\*мин) и  $78,0 \pm 7,1\%$ , а адгезивная активность тромбоцитов на стекле –  $50,5 \pm 9,5\%$ . Эти параметры соответствовали пулам клеток, которые используются для получения концентрата тромбоцитов. Окрашенные трипафлавином-АО тромбоциты проявляли такую же агрегационную и адгезивную активность, что и неокрашенные (табл. 2). Таким образом, предложенная витальная окраска

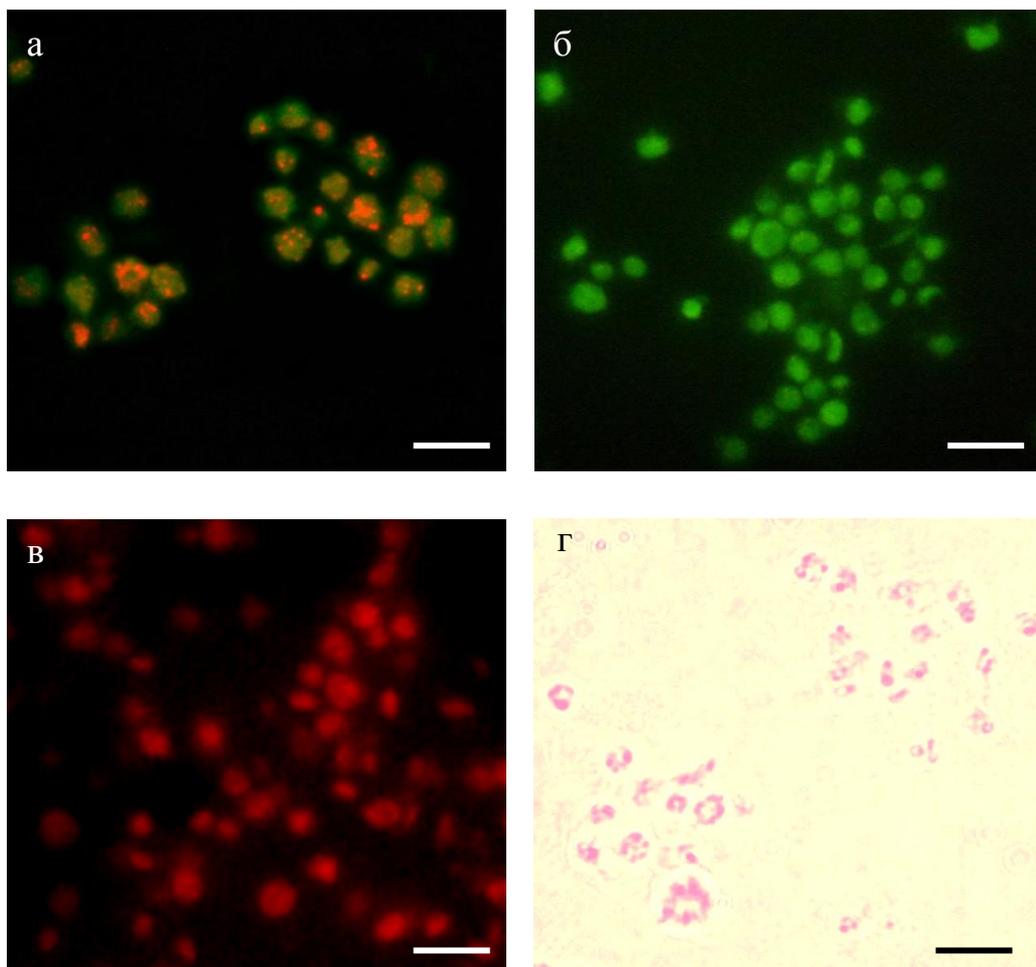


Рисунок 6. Витальное окрашивание тромбоцитов человека с помощью разных красителей:

Обозначения: а– трипафлавин-АО; б – трипафлавин; в – родамин С; г- нейтральный красный. Масштабная линия – 10 мкм.

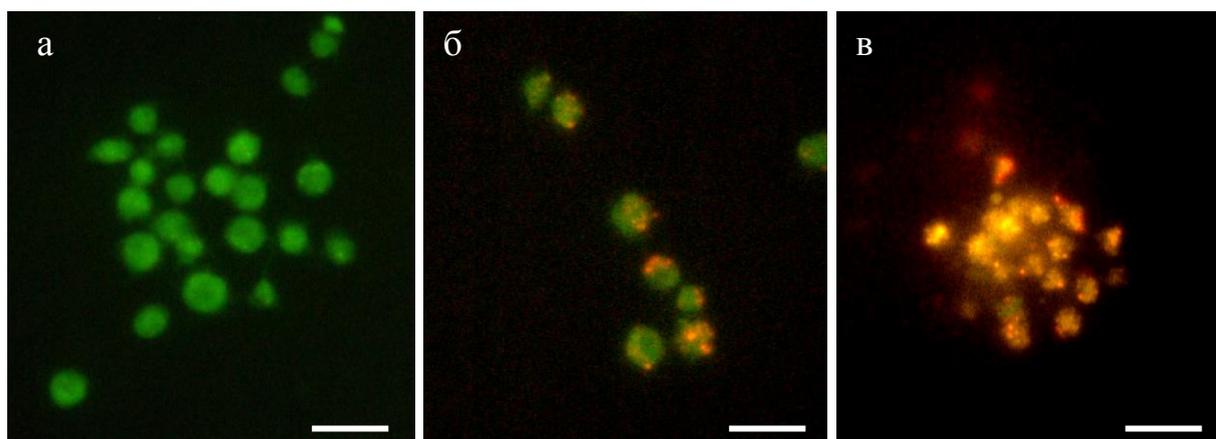


Рисунок 7. Свечение тромбоцитов человека при разном соотношении трипафлавина и АО в готовом витальном красителе: а – 2:1; б – 1:1; в - 1:2. Масштабная линия – 10 мкм.

тромбоцитов для оценки морфофункционального статуса позволяет сохранить функциональную активность клеток.

Таблица 2

Сравнение функциональной активности неокрашенных и окрашенных тромбоцитов человека

Тромбоциты крови доноров (Концентрация клеток 250-275 тыс/мкл)	Параметры функциональной активности тромбоцитов		
	Агрегационная активность (Ом*мин) Индуктор - 2мкг/мл коллагена	Агрегационная активность (%) Индуктор - 5мМ АДФ	Адгезивная активность на стекле, %
Неокрашенные клетки	62,4±7,7	78,0±7,1	50,5±9,5
Клетки, окрашенные трипафлавином-АО	60,7±7,3	77,5±6,8	50,4±9,3

### 3.3. Оценка жизнеспособности витально окрашенных тромбоцитов

В ходе разработки витального красителя на основе трипафлавина –АО исследована жизнеспособность тромбоцитов как проявление его возможного токсического действия на клетки. Для этого проведено 20 серий экспериментов по исследованию влияния предложенного красителя на культуру фибробластов человека линии М-22. Показано, что окрашивание трипафлавином-АО не приводило к видимым нарушениям структуры этих клеток. При этом интенсивность красного свечения кислых органелл фибробластов (лизосомы, секреторные везикулы, эндосомы) сохранялось в течение 1-2 суток после окрашивания, зеленого свечения цитоплазмы – в течение 3 суток (рис. 8). Следовательно, в течение указанного срока не происходило нарушения структуры и функционирования этих органелл.

Проведенный анализ витально окрашенных тромбоцитов, хранившихся в течение 24 часов при 22°С, показал, что через 1 сутки хранения витально окрашенные тромбоциты имели такую же интенсивность зеленого свечения цитоплазмы и красного свечения гранул, что и до хранения (рис. 9).

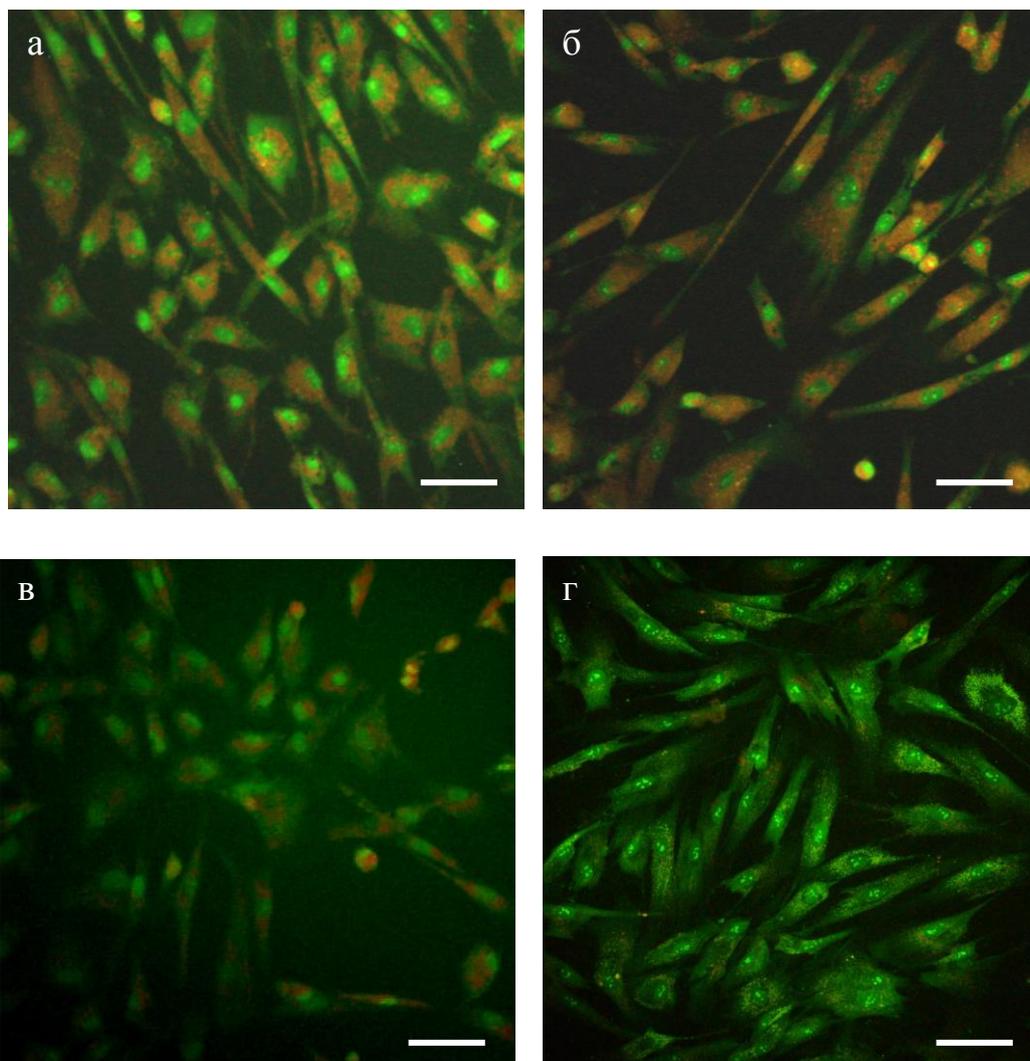


Рисунок 8. Фибробласты человека линии M22, витально окрашенные трипафлавином-АО. а – свежееккрашенные фибробласты; б – фибробласты через 1 сутки; в – фибробласты через 2 суток; г – фибробласты через 3 суток культивирования. Масштабная линия – 10 мкм.

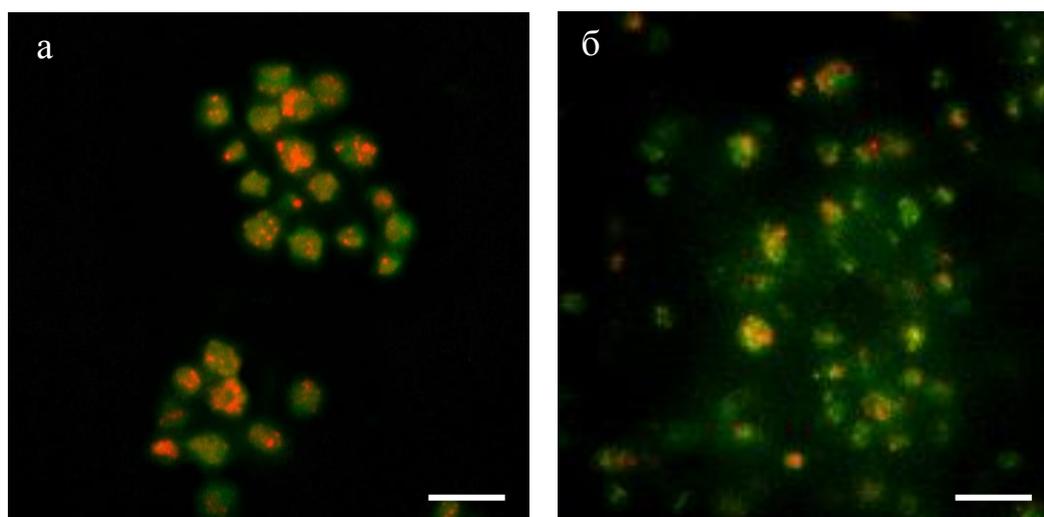


Рисунок 9. Тромбоциты человека, витально окрашенные трипафлавином-АО. а – свежееккрашенные тромбоциты; б – тромбоциты через 1 сутки хранения при 22°C. Масштабная линия – 10 мкм.

Следовательно, окрашиванием трипафлавином–АО не приводит к нарушению структуры и функционирования тромбоцитов.

Таким образом, предложенный витальный краситель на основе флуорохромов трипафлавина и АО в соотношении 1:1 позволяет дифференциально окрашивать тромбоциты человека, отчетливо выявлять контуры и размеры тромбоцитов, а также гранулы в их составе без видимых повреждений структуры и функций этих клеток. Следовательно, обосновано использование окраски трипафлавином-АО для анализа структурной целостности и функциональной активности тромбоцитов.

### **3.4. Параметры морфофункциональной оценки тромбоцитов человека**

Для интегральной оценки структурной целостности и функциональной активности тромбоцитов человека предложен метод витального окрашивания клеток. Для этого разработаны следующие морфофункциональные параметры.

1. Концентрация тромбоцитов (Стр.) в анализируемом образце (тыс/мкл). Стр. определяют с помощью гематологического анализатора.
2. Относительное содержание тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр.), выражают в %. При большом увеличении (объектив x100) оценивают от 150 до 200 окрашенных клеток и регистрируют количество тромбоцитов, содержащих более 3 гранул в цитоплазме и выражают в %. Например, при исследовании 150 тромбоцитов 85 клеток содержали гранулы. Относительное содержание тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр.) равна  $85:150 \times 100 = 56,5\%$ .
3. Концентрация тромбоцитов с гранулами (Стр.гр.) в анализируемом образце (тыс/мкл). Определяется по формуле -  $\text{Стр.гр.} = \text{Стр.} \times \text{Дтр.гр.}$ , т.е. количество тромбоцитов в образце (тыс/мкл) x Доля тромбоцитов с гранулами (100%=1,0; 25%=0,25; 50%=0,5; 75%=0,75 и т.д.).

Например, при исследовании концентрата тромбоцитов количество клеток составило 2000 тыс/мкл, а доля тромбоцитов с гранулами составила 69,3% или в доле 0,693. Количество тромбоцитов с гранулами в концентрате тромбоцитов равнялось  $2000 \text{ тыс/мкл} \times 0,693 = 1386 \text{ тыс/мкл}$ .

4. Морфофункциональная активность тромбоцита (МФАТ) в популяции анализируемого образца крови, плазмы обогащенной тромбоцитами, тромбоцитном концентрате. МФАТ отражает целостность внутренней структуры тромбоцитов. Для оценки МФАТ измеряют яркость свечения от 100 до 200 витально окрашенных трипафлавином-АО клеток, рассчитывают среднюю величину интенсивности свечения тромбоцита. Единицу яркости свечения выражают в фут-канделах на 1 клетку или в баллах. 1 фут-кандел эквивалентен 1 баллу.

Например, при исследовании популяции из 100 тромбоцитов 72 клетки (72% или 0,72) содержали более трех гранул и 28 клеток (28% или 0,28) не содержали гранул. Яркость свечения клеток с гранулами варьировала от 60 до 70, составляя в среднем 66,3 фут-кандел на 1 тромбоцит; яркость свечения клеток без гранул - варьировала от 10 до 30, составляя в среднем 17,7 фут-кандел на 1 тромбоцит. Расчет морфофункциональной активности тромбоцитов анализируемой популяции:  $\text{МФАТ} = 66,3 \times 0,72 + 17,7 \times 0,28 = 47,7 + 5,0 = 52,7$  фут-кандел на 1 клетку или 52,7 баллов

5. Адгезивная активность тромбоцитов (ААТ) на стекле. ААТ отражает содержание в популяции тромбоцитов клеток, способных к адгезии. Для оценки ААТ препарат с прижизненно окрашенными трипафлавином-АО клетками на стекле помещают на 10-15 мин в термостат при 37°C, затем с помощью флуоресцентного микроскопа определяют количество адгезировавших тромбоцитов в расчете на 100 или 150 анализируемых клеток. Адгезировавшие тромбоциты представляют собой большие распластанные клетки овальной или округлой формы (их диаметр в 2-3 раза больше диаметра исходных неадгезировавших тромбоцитов), в которых гранулы распределены

по периферии клетки вблизи ее границ или уже выходят за пределы клетки. Адгезивная активность выражают в % адгезировавших тромбоцитов к общему числу обследованных тромбоцитов или в баллах. 1% адгезивной активности равен 1 баллу. Например, при исследовании 150 витально окрашенных тромбоцитов отмечено 95 больших распластанных по стеклу клеток. Адгезивная активность тромбоцитов (ААТ) равна  $95:150 \times 100 = 63,3\%$  или 63,3 балла.

6. Морфофункциональный статус тромбоцитов (МФСТ). МФСТ является интегральным параметром, оценивающим биологическую полноценность исследуемых тромбоцитов. МФСТ определяют по сумме МФАТ и ААТ и выражают в баллах. При 80-130 баллах МФСТ считают нормальным, при 60-79 баллах – сниженным, при 41-59 баллах – низким, при менее чем 40 баллах – очень низким, при 131-150 баллах - высоким, при 151-170 баллах - очень высоким.

### **3.4 Оценка популяции витально окрашенных тромбоцитов с помощью проточной цитометрии**

Методы проточной цитометрии широко используются в гематологии и клеточной биологии для анализа структуры популяций клеток. Преимуществами проточной цитометрии является возможность проводить анализ большого объема выборки (до 500 тыс. клеток) в автоматическом режиме. Большинство методов проточной цитометрии основаны на анализе окрашенных клеток. В настоящем исследовании проведена оценка популяции витально окрашенных трипафлавином-АО тромбоцитов с помощью проточного сортера MoFlo XDP. Проведено 20 серий экспериментов у 20 доноров. При исследовании использовались гистограммы распределения сигналов с прямым и боковым светорассеиванием, интенсивности флуоресценции в каналах с длинами волн 525 нм (зеленое свечение цитоплазмы тромбоцитов) и 650 нм (красное свечение гранул тромбоцитов).

События с высокой интенсивностью свечения при 650 нм (более 100 у.е.) оценивали как клетки с гранулами. Одновременно оценивали относительное содержание тромбоцитов с гранулами с помощью флуоресцентного микроскопа.

Установлено, что витально окрашенные триафлавином-АО тромбоциты распределялись в зависимости от интенсивности флуоресценции. Процент событий с высокой интенсивностью свечения при 650 нм (более 100 у.е.), зарегистрированных MoFlo XDP, составил в среднем  $54,8 \pm 6,1\%$ , значения относительного содержания гранул в тромбоцитах БотП с помощью проточной цитометрии является эффективной и воспроизводимой.

Дальнейшая сепарация клеток по степени интенсивности флуоресценции витально окрашенных тромбоцитов приводила к спонтанной активации тромбоцитов, что сопровождалось резким снижением общего числа событий с высокой интенсивностью свечения при 650 нм (рис.10). Возможными факторами, приведшими к дегрануляции, являются воздействие лазерного излучения или электромагнитного поля, отклоняющего клетки во время их сортировки.

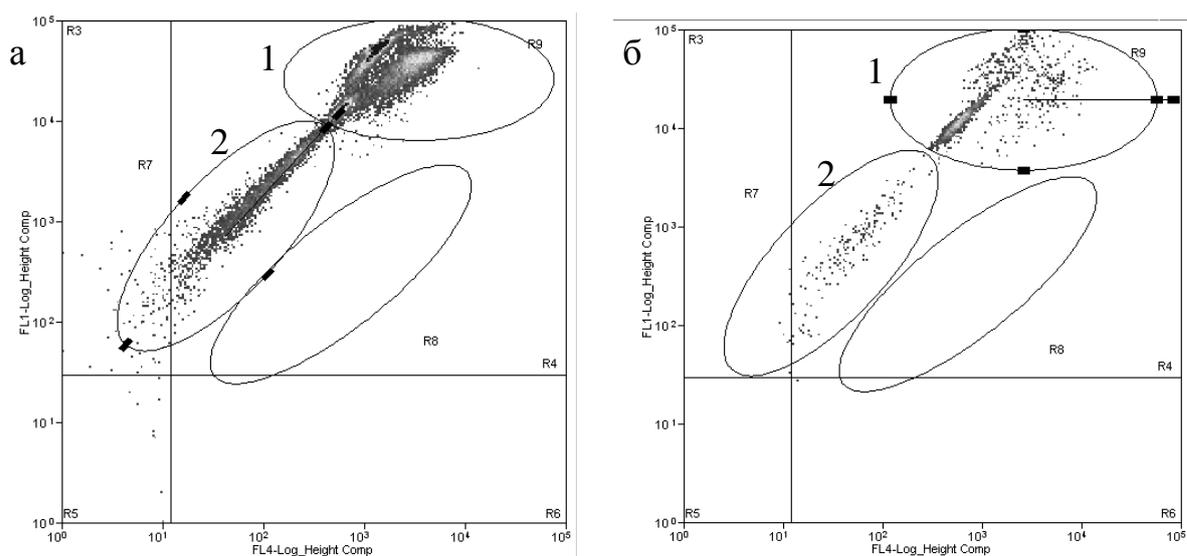


Рисунок 10. Структура популяции витально окрашенных тромбоцитов с помощью MoFlo до сепарации (а) и после сепарации (б). Цифрой 1 обозначена популяция тромбоцитов с гранулами, цифрой 2 – популяция тромбоцитов без гранул

### 3.5. Сравнение морфофункциональных параметров тромбоцитов с их активностью

Проведено 100 серий экспериментов по исследованию агрегационной активности и морфофункционального статуса тромбоцитов крови доноров. В ходе экспериментальной работы установлена прямая корреляционная связь между агрегационной активностью и морфофункциональными параметрами тромбоцитов доноров: Стр.гр. ( $r=0.925$ ,  $p<0,01$ ), МФАТ ( $r=0.849$ ,  $p<0.01$ ), ААТ ( $r=0.741$ ,  $p<0,01$ ) и МФСТ ( $r=0.816$ ,  $p<0,01$ ). Установлена регрессионная зависимость между агрегационной активностью и  $C_{тр.гр.}$  в крови ( $R^2=0,915$ ,  $y=-4E-09x^5+2e-06x^4-0,0006x^3+0,0842x^2-4,8091x+127,53$ ), что позволяет использовать этот параметр для интегральной оценки функциональной активности всей популяции циркулирующих тромбоцитов (рис.11). Также установлена регрессионная зависимость между ААТ и МФАТ ( $R^2=0,924$ ,  $y=0,0059x^3+0,1363x^2+1,0936x-2,518$ , рис.12). Следовательно, предложенный метод морфофункционального исследования тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания является адекватным для оценки биологической полноценности тромбоцитов.

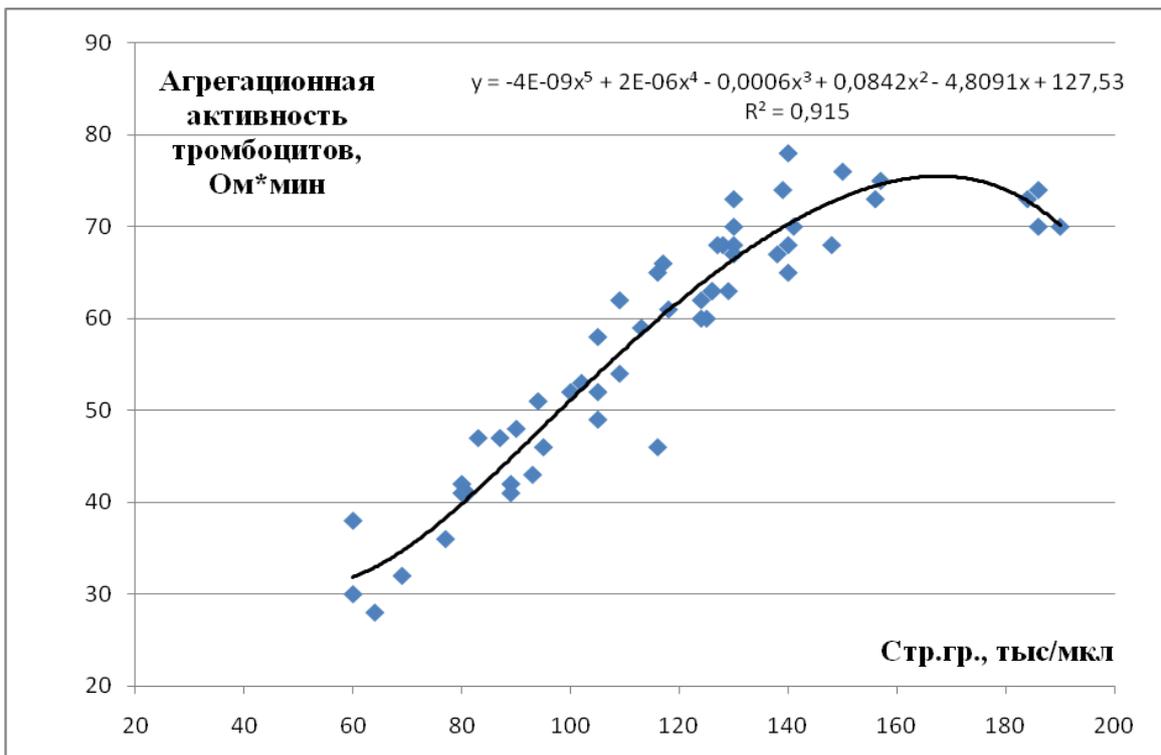


Рисунок 11. Взаимосвязь между концентрацией тромбоцитов с гранулами и агрегационной активностью тромбоцитов.

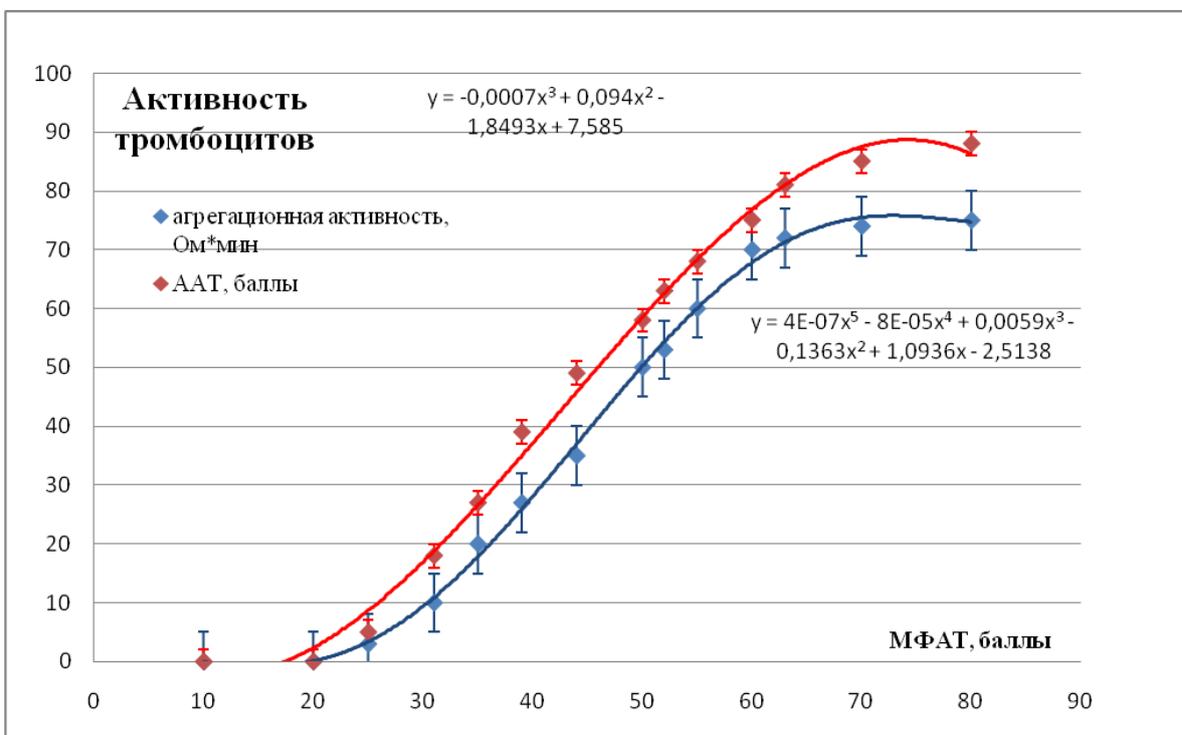


Рисунок 12. Взаимосвязь агрегационной, адгезивной и морфофункциональной активности тромбоцитов человека.

### **3.6. Оценка рост-стимулирующего действия тромбоцитов с помощью морфофункционального анализа клеток.**

В настоящее время широко распространено использование тромбоцитов человека в качестве средства стимуляции регенеративных процессов при различных патологиях [33,92,112]. Считается, что регенеративное действие тромбоцитов определяется содержанием в них различных индукторов репарации и ростовых факторов, в т.ч. PDGF(тромбоцитарный фактор роста).

Показано, что PDGF стимулирует пролиферативную, секреторную и миграционную активность мезенхимальных клеток [93,101,125], является ко-фактором других ростовых факторов – в частности, фактора ангиогенеза VEGF[125]. Эти свойства делают PDGF привлекательным для использования в различных клеточных технологиях, в частности, при производстве биотрансплантатов. Вместе с тем, избыточное содержание PDGF в крови человека вызывает неконтролируемую пролиферацию стромальных клеток костного мозга, гладкомышечных клеток, макрофагов, что в свою очередь может стать причиной развития атеросклероза, фиброза, и некоторых злокачественных неоплазий [101,104].

В организме человека главным источником PDGF являются тромбоциты [6,54]; при различных тромбоцитопатиях содержание PDGF в тромбоцитах резко снижено или вообще отсутствует [6,54,55,107]. PDGF содержится в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов и высвобождается в ходе активации тромбоцитов или при их повреждении [54]. После активации тромбоцитов свободный PDGF находится в сыворотке крови, которая может быть использована в качестве его источника. Однако при таком применении сыворотки возникает необходимость оценки концентрации PDGF в сыворотке и ее влияния на жизнеспособность клеток человека. Поскольку PDGF выделяется из тромбоцитарных гранул, есть основание полагать, что содержание PDGF конечной сыворотки можно оценить в ходе морфофункционального анализа тромбоцитов с гранулами. В связи с этим было проведено исследование рост-

стимулирующего действия PDGF тромбоцитов с помощью морфофункционального анализа клеток

В качестве источника тромбоцитов использовали кровь 12 доноров. Концентрация ростового фактора PDGF варьировала от 0 до 2 пг/мл в плазме и от 90 до 390 пг/мл в сыворотке крови. В плазме тромбоциты не имеют видимых повреждений их исходной структуры, поэтому PDGF выявляется лишь в следовых количествах. При получении сыворотки образование тромбофибринового сгустка сопровождается массовым выбросом содержимого гранул тромбоцитов, в том числе PDGF.

Установлена прямая корреляционная связь между содержанием PDGF в сыворотке крови и морфофункциональными параметрами тромбоцитов исходной крови: концентрацией тромбоцитов с гранулами ( $r=0.931$ ,  $p<0,01$ , рис. 13а) и морфо-функциональной активностью тромбоцитов ( $r=0.92$ ,  $p<0,01$ , рис. 13б). У доноров с концентрацией PDGF в сыворотке более 300 пг/мл отмечены повышенные значения Стр.гр. и МФАТ. При этом 25-30% всех тромбоцитов с гранулами составляли клетки, содержавшие более 20 гранул на 1 клетку. Эти данные обосновывают возможность оценки конечной концентрации PDGF в сыворотке с учетом результатов предложенного морфофункционального анализа витально окрашенных тромбоцитов.

Для изучения влияния PDGF сыворотки на пролиферативную активность клеток линии М-22 в каждую лунку 6-ти луночных планшетов вносили от 0,5 до 2 мл сыворотки с известной концентрацией PDGF. В результате общий объем среды в каждой лунке составил 2-4 мл, конечное содержание PDGF в расчете на 1 лунку опыта— от 20 до 300 пг. Наблюдение проводили в течение 5 суток. Исходное количество клеток во всех лунках составляло 100-110 тыс на лунку.

При содержании PDGF до 150 пг на 1 лунку увеличение содержания ростового фактора сопровождалось устойчивым повышением индекса

пролиферации клеток ИП<sub>3</sub>. Так, если в контроле численность фибробластов линии М-22 к 3-м суткам составила 150 тыс на 1 лунку, ИП<sub>3</sub>=1.50, то при концентрации PDGF 20 пг – 170 тыс на 1 лунку, ИП<sub>3</sub>= 1.69; при 40 пг – 210 тыс на 1 лунку, ИП<sub>3</sub>= 2.08; при 60 пг – 250 тыс на 1 лунку, ИП<sub>3</sub>= 2.45. Рост численности клеток в контроле и при 20-60 пг PDGF продолжался до конца 5-х суток.

При содержании PDGF 80 -150 пг на 1 лунку наблюдался интенсивный рост клеток на 2-3 сутки: на 2-е сутки культивирования общее число фибробластов увеличилось на 100-150%, на 3-и – на 50-70% по сравнению с исходными значениями. В результате к концу 3-х суток была достигнута максимальная численность клеток, которая составила от 300 до 400 тыс на 1 лунку (рис. 14). Значения ИП<sub>3</sub> при содержании PDGF 80 пг составили 2.91, при 100 пг – 3.03, при 120 пг -3.18, при 150 пг – 3.63, что в 1.9 – 2.4 раза превышает значение ИП<sub>3</sub> в контроле. К 4-м суткам в лунках с 80 -150 пг PDGF происходила стабилизация численности клеток.

По всей видимости, содержание PDGF в среде, равное 80-150 пг, является наиболее оптимальным для быстрого увеличения числа клеток в культуре в течение 1-3 суток. Более длительное культивирование клеток при таком содержании PDGF уже не сопровождается ростом численности клеток, хотя возможно, что этот эффект вызван ограниченностью площади дна лунки (10,17 см<sup>2</sup>). Через 3 суток в культуре со 150 пг PDGF образуется плотный конфлюэнтный монослой с максимальным насыщением культуры (рис. 14). Не исключено, что в более крупных флаконах при 150 пг PDGF можно было бы наблюдать дальнейшее увеличение численности клеток.

При увеличении содержания PDGF до 170 – 250 пг на 1 лунку активный рост численности фибробластов прекратился уже на 2-е сутки культивирования. ИП<sub>3</sub> составил при 170 пг PDGF 3.11, при 190 пг – 3.06, при 240 пг – 2.50. Общее число клеток на лунку к концу 3-х суток составило 300-330 тыс при 170-190 пг и 250-270 тыс при 200-250 пг PDGF. При дальнейшем

культивировании в лунках с 170-190 пг PDGF численность клеток не претерпевала видимых изменений, тогда как в лунках, содержавших 200-250 пг PDGF, наблюдалось постепенное снижение количества клеток. Этот процесс был особенно выраженным при содержании PDGF 240-250 пг (рис. 13). При 300 пг PDGF численность клеток практически не менялась в течение всего времени культивирования – с 1-х по 3-и сутки отмечено снижение общего количества клеток ( $ИП_3=0.8$ ), на 4-е сутки наблюдалась слабая пролиферативная активность, которая затем сменилась новым падением количества клеток до их исходного значения (рис. 14).

Можно полагать, что содержание PDGF в среде более 200 пг угнетает жизнеспособность культивируемых клеток. Это предположение подтверждается при анализе целостности клеточных мембран (ЦКМ) исследуемых фибробластов. Параметр ЦКМ отображает жизнеспособность и секреторную активность клеток, в норме его значения у фибробластов человека составляют  $38,5 \pm 2,5$  балла (рис. 15а,а'). Значения ЦКМ в контрольной культуре составили  $38,7 \pm 1,2$  баллов, при 20-80 пг PDGF –  $38,2 \pm 1,8$  баллов, при 100-150 пг PDGF –  $37,6 \pm 2,1$  баллов, т.е. при содержании PDGF до 150 пг жизнеспособность исследуемых фибробластов регистрировалась в пределах контрольных значений без видимых изменений их структуры (рис. 15б,б'). При высоких содержаниях PDGF (190-300 пг на 1 лунку) отмечено снижение ЦКМ фибробластов: при 190-200 пг PDGF ЦКМ составил  $31,5 \pm 1,7$  баллов, при 240 пг PDGF –  $30,0 \pm 1,8$  балла, при 250-300 пг PDGF –  $22,5 \pm 2,7$  баллов. В лунках, содержавших более 200 пг PDGF, в 5-10 раз повышается число трансформированных клеток (плейоморфные клетки и клетки с измененными контурами ядра), а также число ошаренных клеток, у которых отмечен блэббинг (образование пузырей или вздутий) плазматической мембраны (рис. 15в,в').

Таким образом, содержание PDGF свыше 200 пг на 1 лунку приводит к снижению жизнеспособности фибробластов человека, а при 250-300 пг –

вызывает их массовую гибель. По всей видимости, избыточное содержание PDGF в среде запускает процесс апоптоза фибробластов во избежание их трансформации в клетки с неконтролируемой пролиферацией. Следовательно, использование сыворотки крови человека в работе с клеточными культурами должно проводиться с учетом концентрации PDGF. В случае недоступности методов ИФА концентрацию PDGF в сыворотке можно оценить по морфофункциональным параметрам тромбоцитов цельной крови.

В результате проведенного исследования была разработана оценка морфофункционального статуса тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания клеток трипафлавином и акридиновым оранжевым. Оригинальность метода защищена патентом РФ на изобретение № 2485502 от 20.06.2013. Он позволяет объективизировать биологическую полноценность тромбоцитов структурной целостности и функциональной активности клеток.

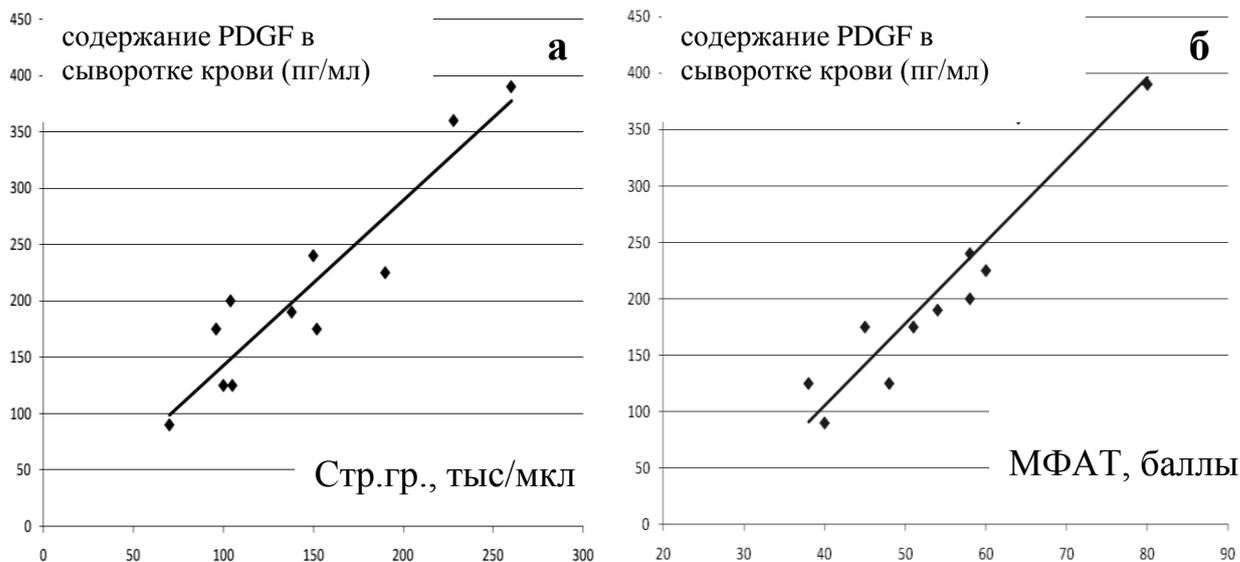


Рисунок 13. Содержание PDGF в сыворотке в зависимости от концентрации тромбоцитов с гранулами (а) и морфофункциональной активности тромбоцитов (б) в исходной крови.

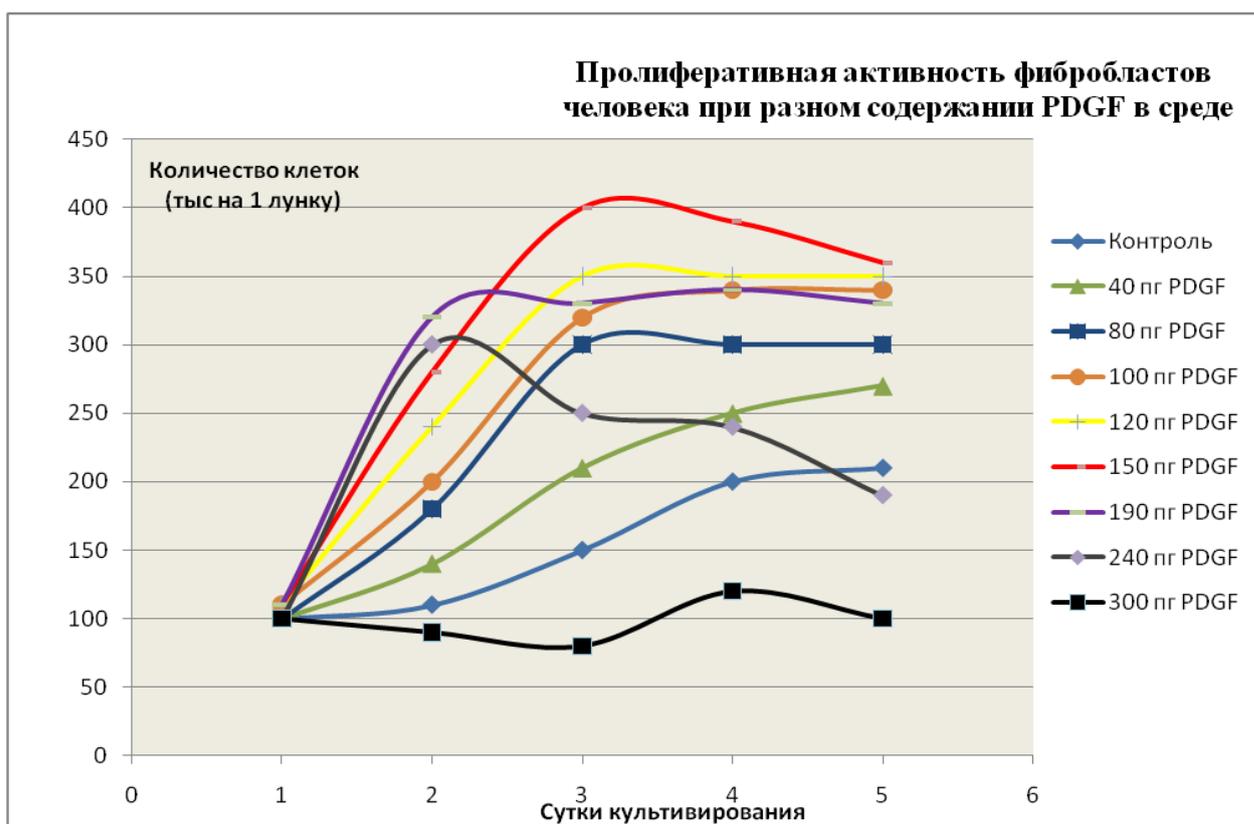


Рисунок 14. Изменение количества фибробластов человека при разном содержании PDGF в культуре.

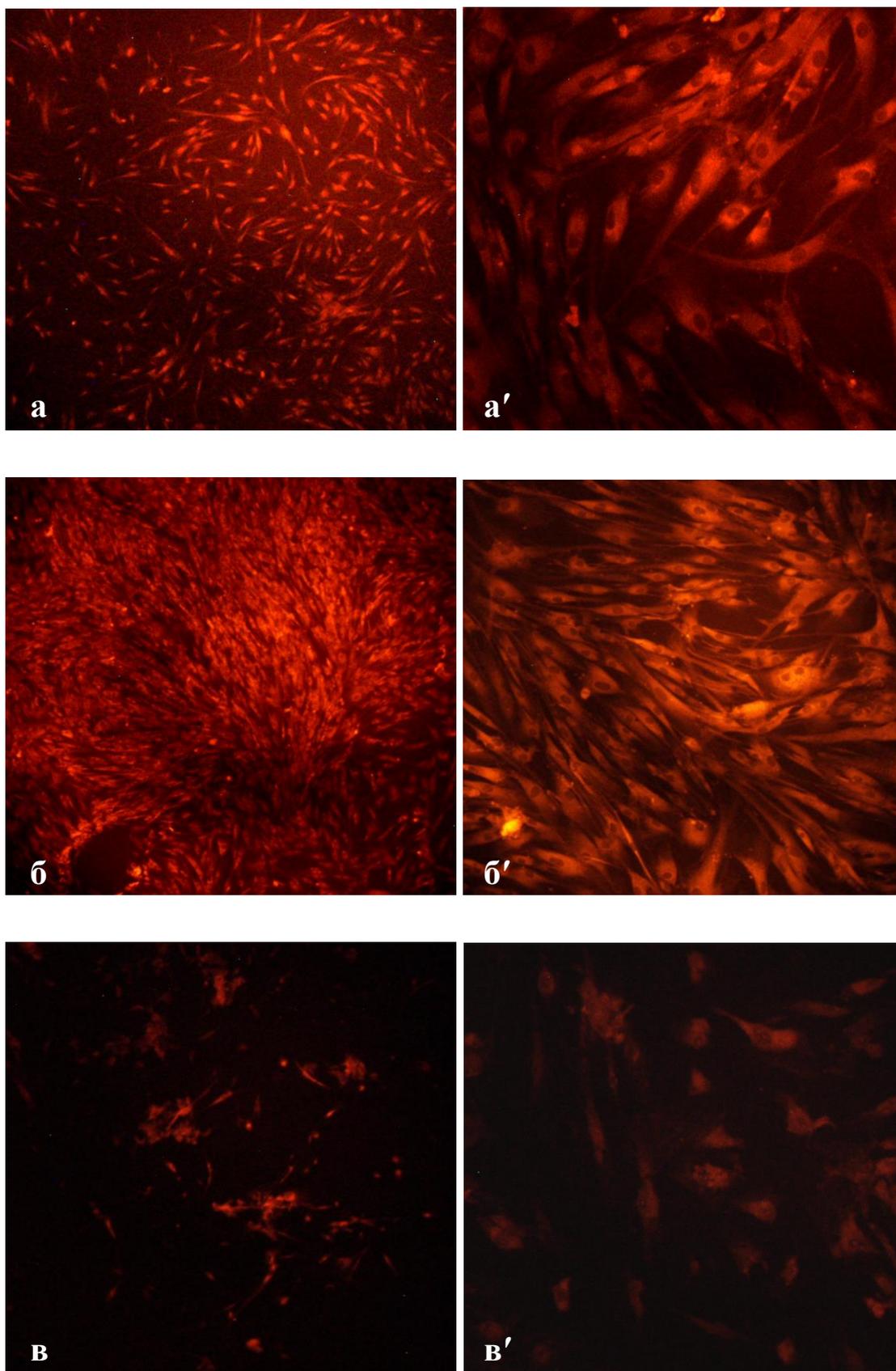


Рисунок 15. Витально окрашенные триафлавином - родамином С фибробласты человека линии M22 через 3 суток культивирования при разном содержании PDGF сыворотки. Первый ряд – контроль (без PDGF), второй ряд – 150 пг PDGF, третий ряд – 300 пг PDGF. Слева – увеличение x40, справа – увеличение x400.

## Глава 4. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИТАЛЬНО ОКРАШЕННЫХ ТРОМБОЦИТОВ

### 4.1. Морфология тромбоцитов

Предложенный метод витального окрашивания трипафлавином-АО тромбоцитов человека позволяет отчетливо выявить в крови доноров 4 основных морфологических типа этих клеток: дискоциты, большие округлые тромбоциты, отросчатые тромбоциты, дегенеративно измененные тромбоциты (рис. 16). Установлено, что соотношение этих морфологических типов тромбоцитов составило 65%, 20%, 10% и 5%, что совпадает с данными, полученными с помощью фазово-интерференционного микроскопа [24]. В образцах богатой тромбоцитами плазмы и КТ доноров соотношение 4 морфологических типов клеток было аналогичным. Во флуоресцентном микроскопе отчетливо выявляются границы отдельных окрашенных тромбоцитов, а также гранулы в их составе (рис. 16). Цитоплазма имеет зеленое свечение, гранулы – красно-оранжевое, при этом отдельные гранулы отчетливо различимы, если их диаметр составляет 300 нм и более. Поэтому для морфофункционального анализа прижизненно окрашенного тромбоцита термин “гранулы” используется для обозначения гранул диаметром не меньше 300 нм.

Дискоциты обычно содержат 5-15 гранул на клетку, причем среди них выявлены мелкие (диаметр 2,0-2,9 мкм), средние (3,0-3,7 мкм) и крупные (3,8-4,5 мкм) клетки (рис. 16а-в). Среди дискоцитов нередко встречаются клетки, содержащие лишь 1-2 гранулы, а также клетки без гранул (рис. 16д, е). В дискоцитах, имеющие 1 или 2 гранулы, очень часто наблюдается контакт гранул с клеточной оболочкой.

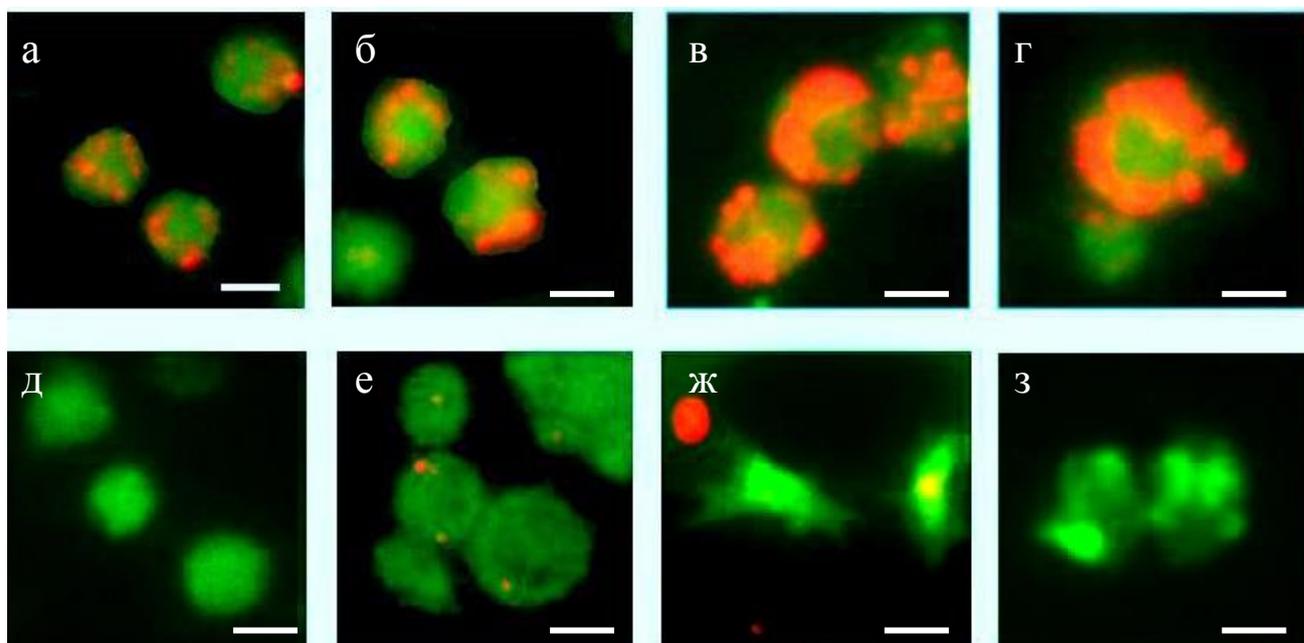


Рисунок 16. Флуоресцентная микроскопия тромбоцитов человека, витально окрашенных трипафлавином-АО.

**Верхний ряд** – тромбоциты с гранулами: **а** – мелкие дискоциты; **б** – средние дискоциты; **в** – крупные дискоциты; **г** – большой округлый тромбоцит. **Нижний ряд** – тромбоциты без гранул: **д** – дискоциты без гранул; **е** – дискоциты с 1-2 мелкими гранулами; **ж** – отростчатые тромбоциты; **з** – дегенеративные тромбоциты. Масштабная линия – 2 мкм.

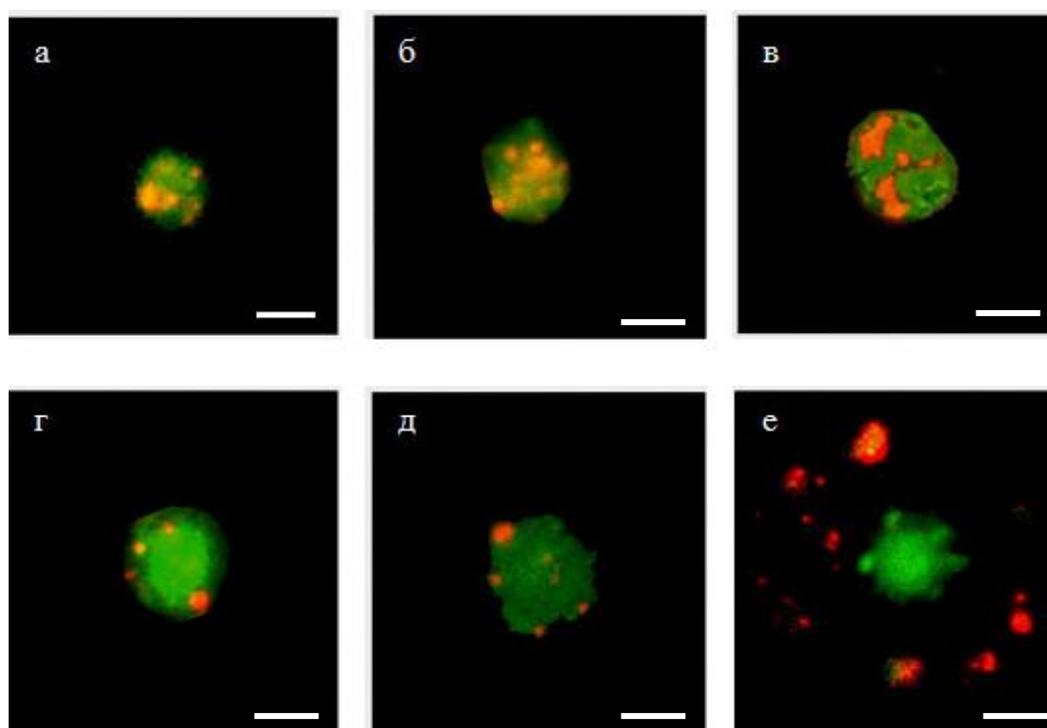


Рисунок 17. Витально окрашенные трипафлавином-АО тромбоциты человека до адгезии (а) и на разных стадиях адгезии (б-е). Масштабная линия – 2 мкм.

Большие округлые тромбоциты обычно содержат более 10 гранул на клетку (рис. 16г), хотя среди них также встречаются клетки без гранул или с 1-2 гранулами (рис. 16е). Отросчатые тромбоциты не содержат гранул или содержат 1-2 мелкие гранулы диаметром 300-320 нм (рис. 16ж). Дегенеративные формы тромбоцитов также лишены гранул, цитоплазма таких тромбоцитов часто образует пузыревидные выпячивания и имеет меньшую яркость свечения (рис. 16з).

Витально окрашенные тромбоциты с гранулами полностью сохраняют способность к активации; благодаря этому удается наблюдать адгезию тромбоцитов на предметном стекле. В ходе адгезии на стекле происходит распластывание тромбоцитов – их диаметр увеличивается в 1,5-2 раза (рис.17а-в); в таких клетках становятся отчетливой видны отдельные гранулы, число которых может достигать 20-30 на 1 клетку. Одновременно с этим наблюдается постепенное смещение гранул к периферии тромбоцитов (рис.17в,г); затем гранулы связываются с клеточной оболочкой (рис.17д) и выходят за пределы тромбоцита (рис. 17е). После выброса гранул тромбоциты меняют форму: из распластанных они становятся более округлыми и образуют короткие выросты (рис. 16е), которые впоследствии могут удлиняться. Такие тромбоциты обладают локомоторной (двигательной) активностью и могут собираться в тесные скопления на предметном стекле. Подчеркнем, что адгезивная активность тромбоцитов с гранулами не зависит от их линейных размеров.

Тромбоциты без гранул или с 1-2 гранулами не способны к адгезии на стекле, независимо от их морфологического типа. Анализ показал, что в течение длительной экспозиции (1-4 часа) на предметном стекле при 37°С дисковидные тромбоциты (клетки “покоя”) не проявляли морфологических изменений, характерных для адгезирующих клеток, т.е. не распластывались и не образовывали отростков; отросчатые тромбоциты не проявляли двигательной активности.

## 4.2. Морфофункциональные свойства витально окрашенных тромбоцитов в зависимости от интенсивности свечения

Оценку биологической полноценности клеток и внутриклеточных структур, окрашенных витальными флуорохромными красителями, часто проводят на основе анализа интенсивности их свечения. Морфологическое исследование витально окрашенных трипафлавином-АО тромбоцитов крови доноров выявило 4 субпопуляции клеток с разной интенсивностью свечения. Две субпопуляции (клетки с яркостью свечения 18-25 и 26-38 фут-кандел) не проявляли функциональной активности. Тромбоциты двух других субпопуляций (клетки с яркостью свечения 40-59 и 60-80 фут-кандел) являются функционально пригодными клетками, обладающими адгезивной и агрегационной активностью (табл. 3). Установлено, что наибольшее количество гранул содержится в клетках яркостью 60-80 фут-кандел – одна такая клетка часто имеет более 10 визуально различимых гранул. Поэтому для обозначения тромбоцитов яркостью свечения 60-80 фут-кандел нами предложен термин «**тромбоциты богатые гранулами**».

Таблица 3.

Субпопуляции витально окрашенных трипафлавином-АО тромбоцитов крови доноров в зависимости от интенсивности свечения.

Субпопуляции тромбоцитов	Яркость свечения 1 клетки, (фут-кандел)	Количество гранул на 1 клетку	Функциональная активность клеток	Распределение субпопуляции тромбоцитов в крови доноров (%)
1-я	18-25	0	не проявляют	10-30
2-я	26-38	1-2		10-30
3-я	40-59	3-7	проявляют	30-40
4-я	60-80	8-20		10-40

**Тромбоциты богатые гранулами (ТБГ)** - это витально окрашенные трипафлавином-АО клетки с яркостью свечения 60 и более фут-кандел (рис. 18). ТБГ чаще всего содержат не менее 8-10 визуально различимых гранул диаметром 400-600 нм, которые распределены по всему объему клетки и интенсивно окрашиваются также на  $Ca^{2+}$  и серотонин; в некоторых случаях размер наблюдаемых гранул может достигать 1000 нм, а их число варьирует от 3 до 7 (предположительно, такая картина является результатом оптического слияния отдельных гранул). Среди ТБГ встречаются мелкие (диаметр 2,2-3,0 мкм), средние (диаметр 3,1-3,7 мкм), а также крупные клетки (диаметр 4,0-4,5 мкм); в крупных тромбоцитах количество гранул на клетку может достигать 15-20. Все тромбоциты богатые гранулами обладают выраженной агрегационной и адгезивной активностью.

Анализ интенсивности свечения ТБГ, витально окрашенных трипафлавином-АО, выявил насыщенность цитоплазмы этих клеток мембранными структурами, определяющих ряд функциональных свойств тромбоцитов. Биологическая полноценность тромбоцитов зависит от целостности их мембранных структур. Известно, что применение криоконсервантов, в частности ДМСО, позволяет значительно удлинить сроки хранения тромбоцитов. Однако, ДМСО обладает токсическим воздействием на клеточные мембраны [9,57,114]. В этой связи было проведено 50 серий экспериментов по исследованию влияния ДМСО на клеточные мембраны различных субпопуляций тромбоцитов, оценка морфофункционального статуса субпопуляций тромбоцитов БоТП в ходе экспозиции с 5-6% ДМСО при 22С°. Установлено, что под действием 5-6% ДМСО в тромбоцитах с гранулами наблюдается деформация плазматической мембраны, разрушение гранул или выход их содержимого за пределы клеток (рис. 19). В субпопуляции тромбоцитов с 3-7 гранулами (яркостью свечения клеток 40-59 фут-кандел) признаки деформации клеток отмечены уже через 10-15 мин экспозиции с 5-6% ДМСО. При этом их адгезивная активность

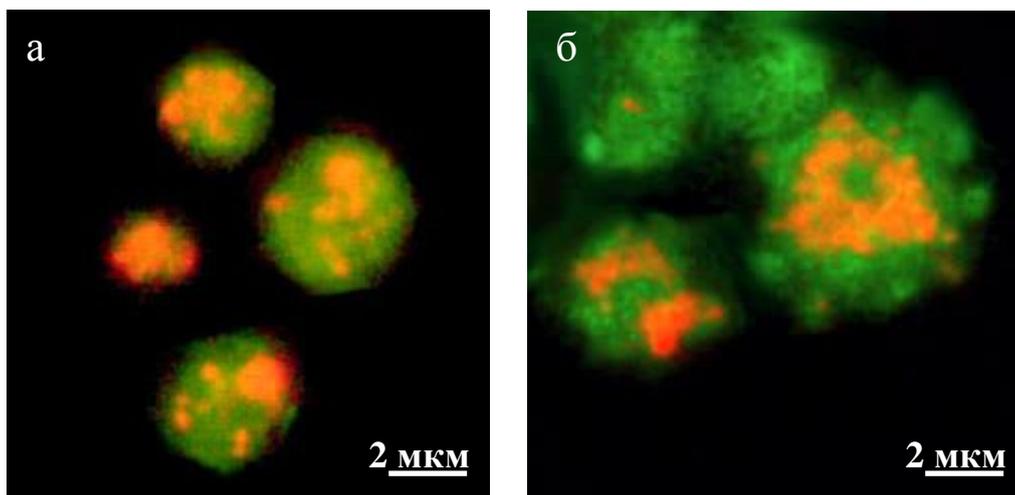


Рисунок 18. Тромбоциты богатые гранулами (ТБГ) во флуоресцентном микроскопе. а – интактные ТБГ; б – адгезия ТБГ на стекле

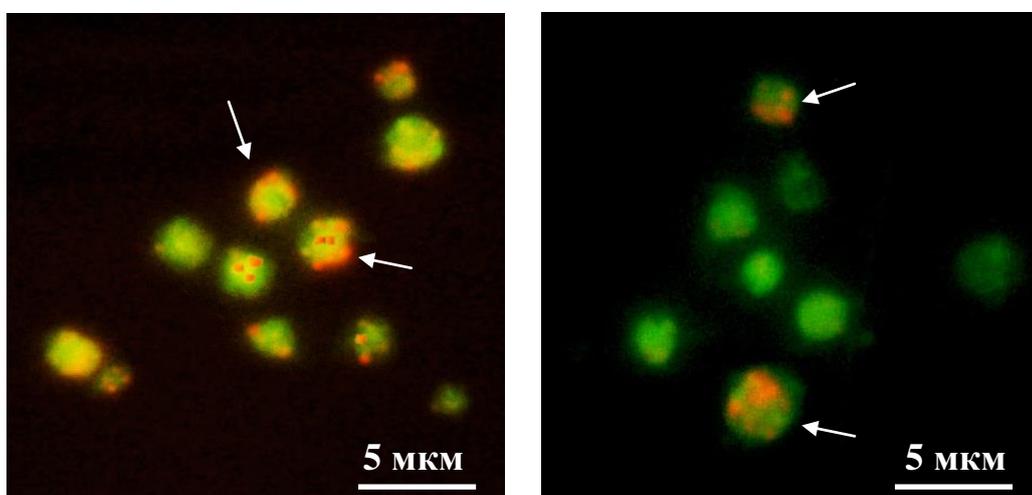


Рисунок 19. Изменение структуры тромбоцитов в ходе экспозиции с 5% ДМСО. а – тромбоциты до экспозиции с ДМСО; б — через 60 мин экспозиции. Стрелками показаны ТБГ.

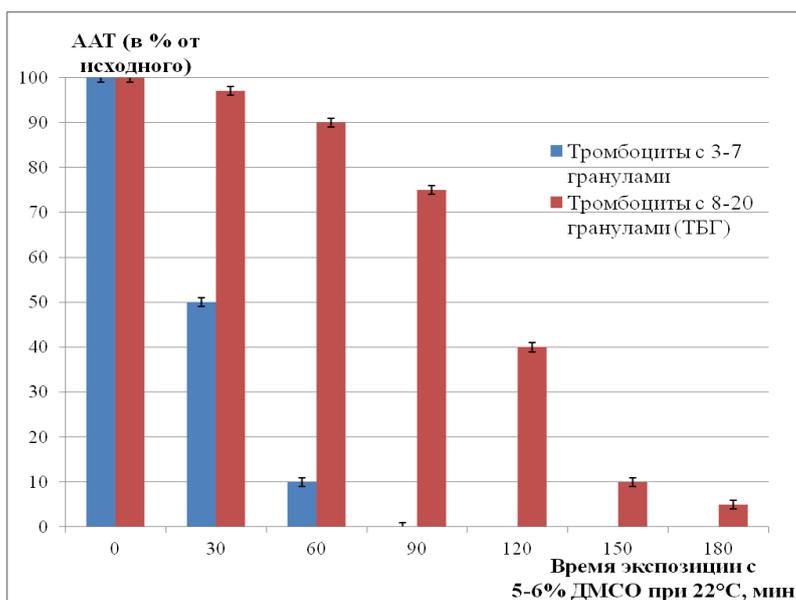


Рисунок 20. Адгезивная активность тромбоцитов в ходе экспозиции с 5-6% ДМСО при 22°C.

тромбоцитов с 3-7 гранулами начинала снижаться через 10-20 минут, а через 80-90 мин вся популяция этих клеток не проявляла адгезивной активности. В субпопуляции ТБГ (яркостью свечения клеток более 60 фут-кандел) признаки деформации клеток наблюдались через более длительный период экспозиции с 5-6% ДМСО – 60-70 мин. При этом адгезивная активность ТБГ сохранялась в течение 70-80 минут экспозиции с 5-6% ДМСО (рис.20). Эти данные указывают на высокую устойчивость мембранной структуры ТБГ к токсическому действию ДМСО. Следовательно, отбор концентратов тромбоцитов (КТ), пригодных для длительного хранения с помощью ДМСО, может проводиться на основе оценки содержания ТБГ в этих клеточных компонентах крови.

#### **4.3. Структура тромбоцитов после индуцированной агрегации**

Способность к агрегации является одной из основных свойств тромбоцитов. В ходе агрегации наблюдается заметное изменение структуры тромбоцита под действием индукторов агрегации, которые подразделяют на “сильные” (коллаген, тромбин) и “слабые” (АДФ, серотонин, адреналин). Степень агрегации тромбоцитов и реакции высвобождения (выброса) зависит от природы агрегирующего агента и его дозы [29,120,128]. Проведено 50 серий экспериментов по оценке степени агрегации тромбоцитов под действием разных индукторов с помощью предложенного морфофункционального метода. Под действием коллагена как в тромбоцитах неразделенной крови, так и в БоТП наблюдалась массовая дегрануляция витально окрашенных клеток. Через 5-10 мин после добавления коллагена в кровь или БоТП относительное содержание тромбоцитов с гранулами резко снижалось и не превышало 1%. При этом наблюдалось заметное снижение интенсивности свечения клеток, МФАТ (в 2,1 раза) и полное отсутствие у них адгезивной активности. Одновременно с этим, в крови и плазме доноров выявлены крупные тромбоцитарные агрегаты диаметром до 100 мкм (рис. 21).

Под действием АДФ агрегационная активность тромбоцитов и реакция высвобождения гранул носила дозозависимый характер (табл. 4). Так, относительное содержание тромбоцитов с гранулами (Dтр.гр.) под действием 0,5мкМ АДФ, снижалось в среднем в 1,12 раза, под действием 1мкМ АДФ – в 2,03 раза, под действием 5мкМ АДФ - в 24,0 раза. При этом агрегационная активность тромбоцитов возрастала с повышением концентрации АДФ: при 0,5мкМ –  $14,9 \pm 2,7\%$ , а при 5мкМ –  $75,1 \pm 8,3\%$ . После окончания агрегации адгезивная активность тромбоцитов при 0,5мкМ АДФ снижалась в 1,10 раза, при 1мкМ АДФ – в 2,12 раза, а при 5мкМ АДФ – полностью отсутствовала (табл. 4). Установлено, что средний диаметр тромбоцитарных агрегатов увеличивается с повышением концентрации АДФ: при 0,5мкМ АДФ он составлял –  $10,1 \pm 1,3$  мкм, при 1мкМ АДФ –  $22,6 \pm 3,1$  мкм, при 5мкМ АДФ –  $45,5 \pm 5,4$  мкм (рис. 22). Необходимо подчеркнуть, что в пробах БотП, обработанных 0,5мкМ АДФ, неагрегировавшие тромбоциты с гранулами сохраняли свою структурную целостность и способность к адгезии на стекле. Под действием коллагена или 5мкМ АДФ в таких пробах отмечена вторая волна агрегации, а также дегрануляция всех тромбоцитов с гранулами и образование ими крупных тромбоцитарных агрегатов. Следовательно, под действием “сильных” индукторов агрегации (коллаген) происходит необратимая активация всей популяции тромбоцитов с гранулами, тогда как под действием “слабых” индукторов (АДФ) степень агрегации тромбоцитов с гранулами и реакции высвобождения зависит от дозы индуктора.

Таким образом, витальное окрашивание тромбоцитов трипафлавином-АО позволило выявить клетки 8 разных морфологических типов. При этом функциональную активность проявляли только дискоциты и большие округлые тромбоциты с гранулами. Анализ интенсивности свечения витально окрашенных тромбоцитов с гранулами выявил различную насыщенность цитоплазмы этих клеток мембранными структурами, которая определяет их биологическую полноценность.

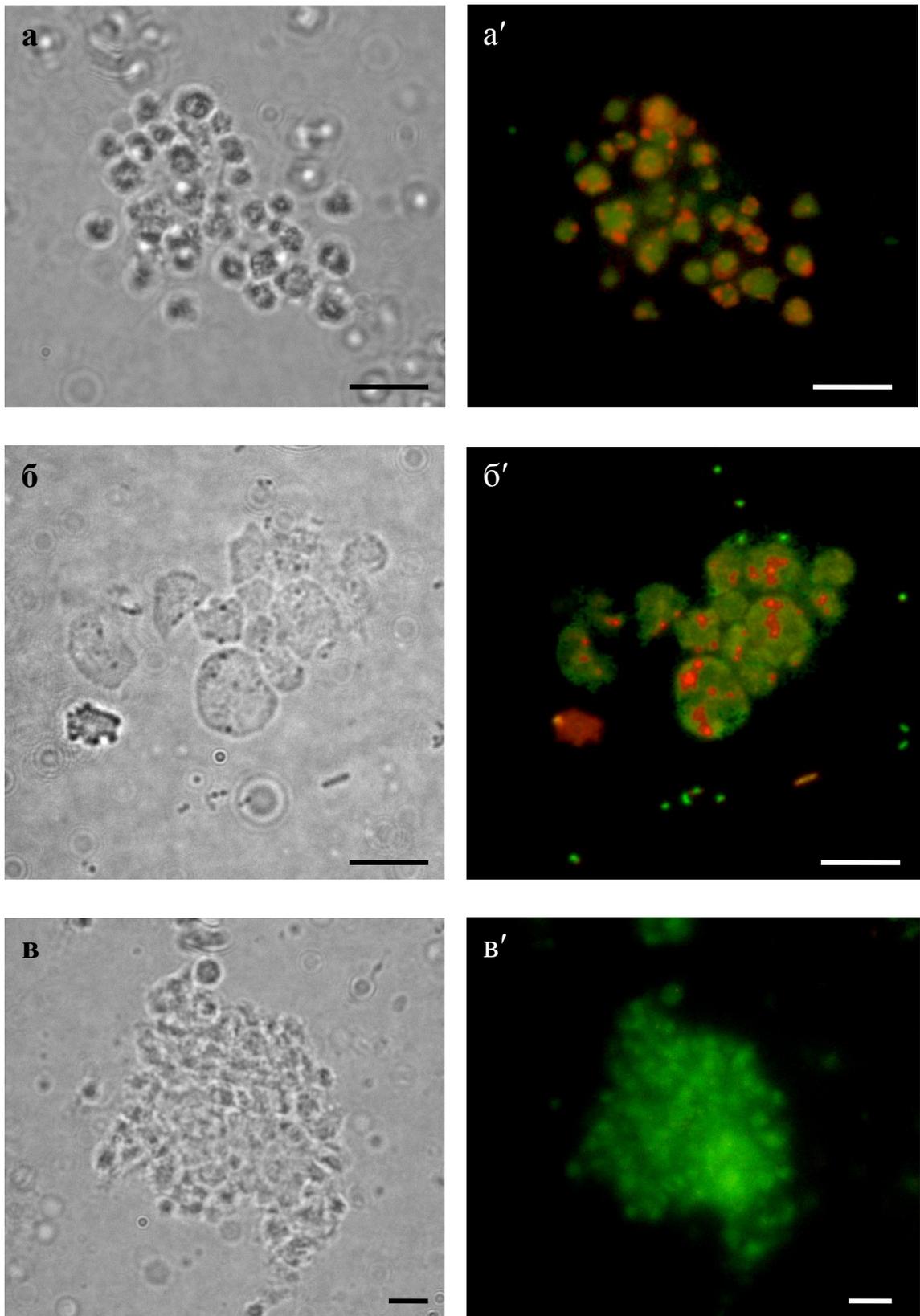


Рисунок 21. Морфология витально окрашенных тромбоцитов до и после активации. а,а' – неактивированные тромбоциты; б,б' – активированные тромбоциты: адгезия на стекле; в,в' – тромбоциты, активированные коллагеном: агрегация. Масштабная линия – 10 мкм.

Таблица 4

Морфофункциональные параметры тромбоцитов БоТП доноров  
(N=50) под действием разных концентраций АДФ

Анализируемые параметры тромбоцитов	до активации АДФ	после активации АДФ		
		0,5мкМ АДФ	1мкМ АДФ	5мкМ АДФ
Дтр.гр., %	60,1±8,1	53,5±5,5	29,5±5,6	2,5±0,4
Агрегационная активность, %	0	14,9±2,7	40,8±3,8	75,1±8,3
Адгезивная активность баллы	58,3±7,6	52,7±2,9	27,5±2,7	0

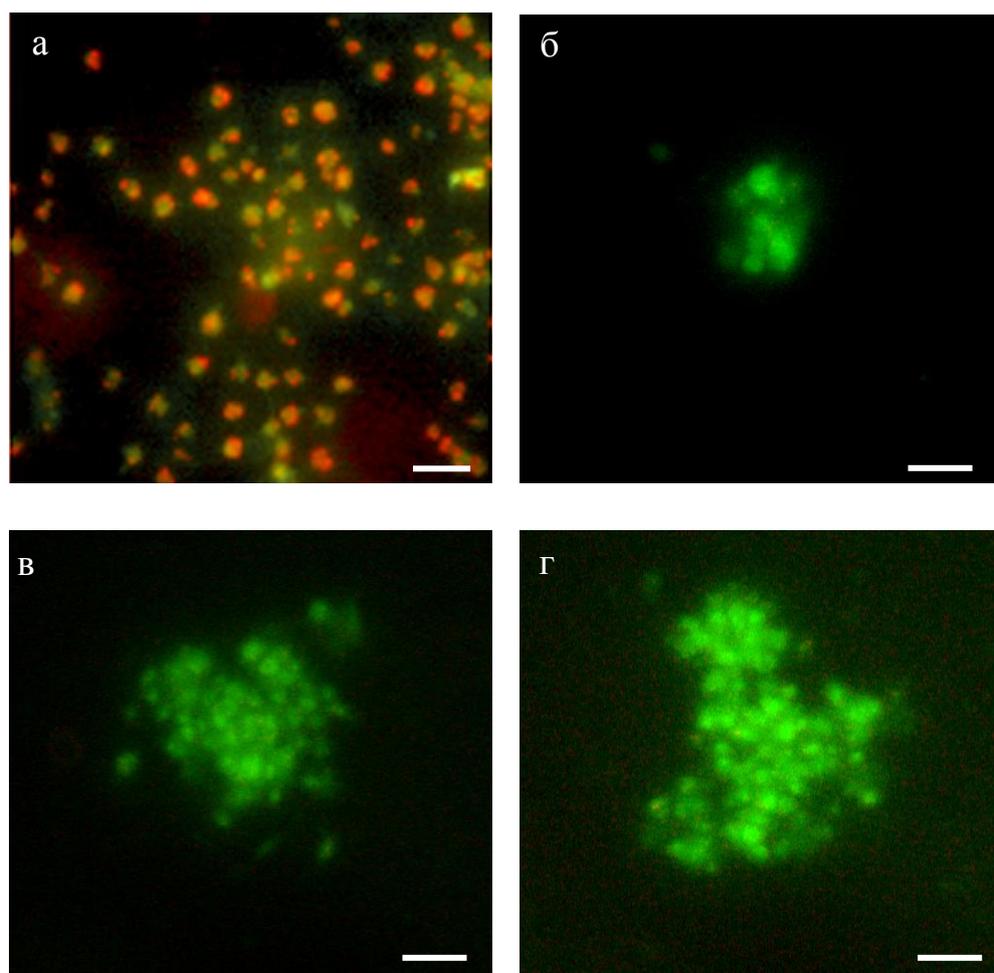


Рисунок 22. Структура тромбоцитарных агрегатов в зависимости от концентрации АДФ: а – тромбоциты до активации АДФ; б – 0,5мкМ АДФ, в – 1мкМ АДФ, г – 5мкМ АДФ. Масштабная линия – 10 мкм.

## ГЛАВА 5. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ТРОМБОЦИТОВ В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

### 5.1. Морфофункциональный анализ тромбоцитов доноров

У обследованных доноров общее содержание тромбоцитов в циркулирующей крови варьировало от 150 до 370 тыс/мкл. В ходе анализа биологической тромбоцитов доноров установлены следующие значения морфофункциональных параметров: Дтр.гр. варьировало от 35 до 75 процентов ( в среднем  $57,6 \pm 10,5$  %), Стр.гр. – от 60 до 190 тыс/мкл ( $116,5 \pm 18,6$  тыс/мкл). МФАТ варьировала от 37 до 60 баллов ( $48,6 \pm 5,2$  баллов), ААТ – от 35 до 75 баллов ( $56,5 \pm 12,5$  баллов), а МФСТ – от 85 до 130 баллов ( $109,1 \pm 11,5$  баллов). В богатой тромбоцитами плазме (БоТП) значимых изменений Дтр.гр., МФАТ, ААТ и МФСТ по сравнению с неразделенной кровью не выявлено ( $p < 0,01$ ). Следовательно, процедура получения БоТП обеспечивает сохранность биологической полноценности клеток). В трансплантологии накоплен опыт заготовки крови от доноров органов (смерть мозга) и клеточный компонент такой крови используется для компенсации кровопотери и иммуномодулирующего действия [51]. В этой связи проведено морфофункциональное исследование тромбоцитов крови доноров органов. Выявлено достоверное снижение всех морфофункциональных параметров тромбоцитов в такой крови (табл. 6). Так, Стр.гр. была снижена в 11 раз , адгезивная активность тромбоцитов – в 3,6 раз по сравнению с таковыми параметрами у доноров крови (табл. 6). Низкая функциональная активность тромбоцитов крови доноров органов указывает на их малую эффективность для компенсации клеточного звена гемостаза.

Анализ распределения 300 доноров по морфофункциональной активности тромбоцитов крови выявил три популяции (рис. 23): основная популяция составила 82% (МФАТ= $48.0 \pm 1.5$  баллов); популяция с пониженной активностью – 16% (МФАТ= $38.5 \pm 2.5$  балла) и популяция с повышенной активностью клеток – 2% (МФАТ= $59.1 \pm 0.9$  баллов).

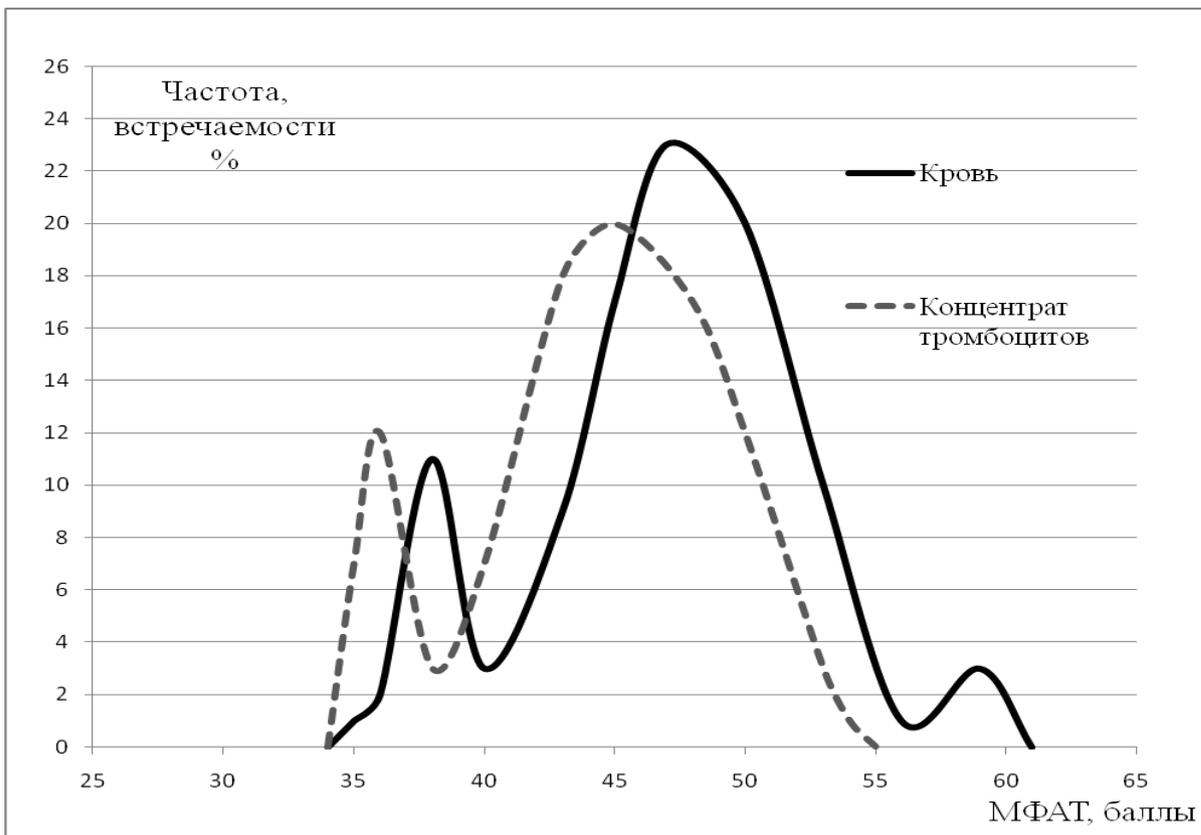


Рисунок 23. Распределение доноров по морфофункциональной активности тромбоцитов в крови и в полученном концентрате тромбоцитов

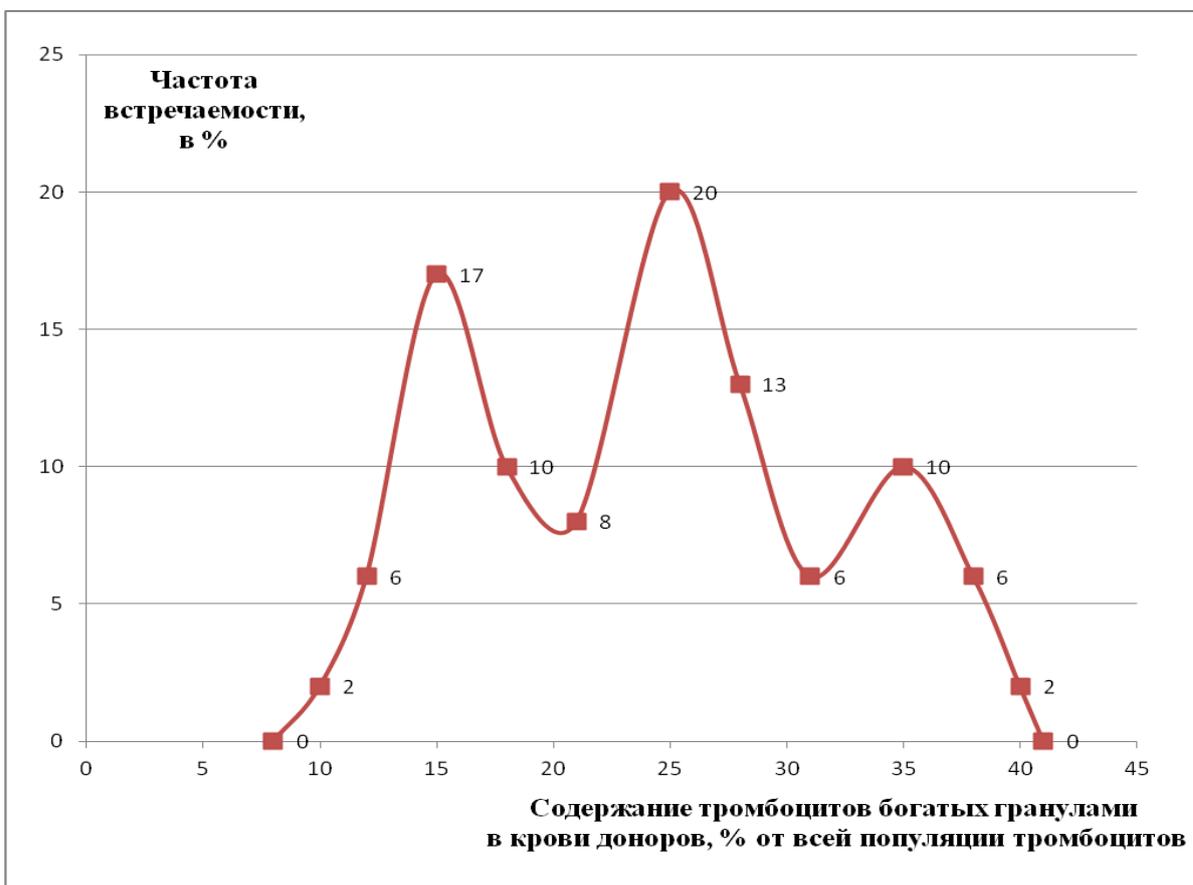


Рисунок 24. Распределение доноров по содержанию тромбоцитов богатых гранулами в неразделенной крови

Распределение доноров по МФАТ в полученных концентратах тромбоцитов было следующим: основная популяция доноров составила 80%, популяция с пониженной активностью клеток увеличилась до 20%, отсутствовала популяции с повышенной активностью клеток (рис. 23).

Проведен анализ распределения доноров по содержанию тромбоцитов богатых гранулами. Выявлено также три популяции доноров (рис. 24): со средним содержанием ТБГ составил 41%, со сниженным содержанием ТБГ – 35% и с повышенным содержанием ТБГ – 24%. Таким образом, у доноров содержание тромбоцитов богатых гранулами в крови может различаться в 3-4 раза.

Полученные данные указывают на явную неоднородность популяции доноров по биологической полноценности тромбоцитов. Следовательно, необходимо учитывать параметры морфофункционального статуса тромбоцитов при получении концентрата тромбоцитов.

## **5.2. Морфофункциональный анализ тромбоцитов доноров в процессе хранения.**

Последние десятилетия отмечены постоянным ростом потребности в тромбоцитах человека для лечения и профилактики геморрагических осложнений, обусловленных снижением количества тромбоцитов или их дисфункцией [38]. Тромбоциты человека активно используют в области гематологии, хирургии, реаниматологии, акушерстве и гинекологии, травматологии, трансплантологии, кардиохирургии [15,34-39,50-53]. Наиболее предпочтительными для трансфузионной терапии считаются концентраты тромбоцитов (КТ), полученные методом аппаратного афереза, однако такой способ выделения тромбоцитов отличается высокой стоимостью и необходимостью использования сложной аппаратуры [10,11,16]. Поэтому, наряду с аферезными КТ экономически выгодным представляется получение пулированных КТ из лейкотромбослая крови разных доноров. Такие КТ

имеют меньшую стоимость и могут быть получены от большего количества доноров [17].

Вместе с тем, клиническое использование любых типов КТ ставит не только проблему оценки эффективности трансфузии тромбоцитов и ее безопасности, но и биологической полноценности и функциональной активности этих клеток [50-53,106,109]. Исследование биологической полноценности тромбоцитов у доноров крови, плазмы и тромбоцитов не регламентировано документами службы крови. Следовательно, имеется необходимость адекватной оценки качества тромбоцитов КТ, особенно, на поздних (4-5 сутки) хранения сроках при комнатной температуре. В этой связи, проведена оценка биологической полноценности клеток в КТ с помощью витального их окрашивания трипафлавином и акридиловым оранжевым.

В концентратах тромбоцитов, полученных методом афереза афКТ, морфофункциональные параметры клеток (Дтр.гр., МФАТ, ААТ и МФСТ) значимо не отличались ( $p > 0,05$ ) от таковых в крови доноров, что указывает на сохранность биологической полноценности тромбоцитов в процессе автоматического афереза. В образцах пулированных КТ (пулКТ) Стр. и Стр.гр. были выше аналогичных показателей в афКТ, тогда как Дтр.гр., ААТ и МФСТ – достоверно ( $p < 0,05$ ) ниже (табл. 5).

Образцы пулКТ вследствие их высокой вариабельности по концентрации тромбоцитов были разделены на 3 группы: 1-я группа (N=8) – с Стр. до  $2,5 \cdot 10^{12}/л$ ; 2-я группа (N=25) – с Стр.  $2,5-5 \cdot 10^{12}/л$ ; 3-я группа (N=17) – с Стр.  $> 5 \cdot 10^{12}/л$ . Установлено, что МФСТ в 1-й группе пулКТ составлял  $98,6 \pm 7,8$ , во 2-й группе –  $87,5 \pm 14,8$ , в 3-й группе –  $80,1 \pm 15,6$  баллов. Между МФСТ 1-й группы пулКТ и МФСТ афКТ (при равной Стр.) достоверных различий не выявлено, тогда как во 2-й и 3-й группе пулКТ (при повышенной Стр.) выявлено снижение МФСТ на 11-19% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с афКТ.

В процессе хранения афКТ и пулКТ при комнатной температуре и постоянном перемешивании не выявлено резкого снижения общей концентрации тромбоцитов. К концу 5-х суток хранения афКТ содержали 85-90% от исходного количества тромбоцитов, а пулКТ – 70-85%. В исследованных КТ в ходе хранения отмечено постепенное снижение концентрации тромбоцитов с гранулами (Стр.гр.), причем динамика уменьшения Стр.гр. была различной в разных группах КТ (рис. 25). Так, в афКТ Стр.гр. практически не снижалась в течение 2 суток хранения. Через 3 суток Стр.гр. в афКТ снизилась в среднем на 70%, через 4 суток – на 95%. Подчеркнем, что через 5 суток хранения афКТ не содержали тромбоцитов с гранулами. В пулКТ уменьшение количества тромбоцитов с гранулами наступало в более ранние сроки их хранения по сравнению с афКТ. Так, в 1-й группе пулКТ Стр.гр. через 2 суток снизилось на 45%, через 3 суток – на 90%, во 2-й группе – соответственно на 90% и 99%. Через 4 суток хранения 1-й и 2-й групп пулКТ не содержали тромбоцитов с гранулами. Подчеркнем, что в 3-й группе пулКТ полное отсутствие тромбоцитов с гранулами уже через 1 сутки хранения (рис. 25).

Выявлено, что с уменьшением Стр.гр. в КТ наблюдалось изменение МФАТ и ААТ, при этом динамика снижения ААТ была сходной с Стр.гр. (рис.26). В афКТ и пулКТ 1-й группы в течение 2 суток хранения МФАТ и ААТ соответствовали норме. Через 3 суток наблюдалось резкое падение этих параметров (до  $31,2 \pm 3,1$  баллов и  $17,5 \pm 3,5$  баллов). Через 4-5 суток значения МФАТ и ААТ в афКТ и пулКТ 1-й группы составляли  $25,8 \pm 1,2$  и 0 баллов, что указывало на функциональную неполноценность тромбоцитов этих КТ. В пулКТ 2-й группы заметное снижение МФАТ и ААТ отмечено уже через 1 сутки хранения (до  $37,9 \pm 3,0$  и  $35,1 \pm 2,1$  баллов), но не выходило за нижние пределы нормы. Через 3 суток хранения МФАТ и ААТ составляли  $26,6 \pm 1,1$  и  $1,5 \pm 0,4$  баллов, что значительно ниже нормы. Выявлено что в пулКТ 3-й группы МФАТ и ААТ уже через 1 сутки хранения соответствовали  $19,6 \pm 2,1$  и 0 баллов, что свидетельствует о функциональной неполноценности

тромбоцитов. Высокий темп уменьшения количество тромбоцитов с гранулами, сниженный уровень МФАТ и ААТ в пулТК при хранении при комнатной температуре и перемешивании можно связать с повышенной концентрацией тромбоцитов по сравнению с афКТ.

Значительно повысить сроки хранения КТ можно путем криоконсервирования тромбоцитов. При этом имеется возможность проводить карантинизацию КТ, создавать банки аутологичных тромбоцитов, транспортировать КТ на большие расстояния [55]. Наиболее изученным и применяемым в клинике криопротектором для замораживания и хранения тромбоцитов как при ультранизких (жидкий азот и его пары), так и при умеренно низких (электрохолодильники на  $-80^{\circ}\text{C}$ ) температурах является диметилсульфоксид (ДМСО) в конечной концентрации 4 — 6% и скорости замораживания от 1 до 5  $^{\circ}\text{C}$  в минуту. В связи с этим проведен морфофункциональный анализ 30 аферезных и пулированных КТ до и после процедуры криоконсервирования с 5% ДМСО и хранения при  $-84^{\circ}\text{C}$ .

Установлено, что в процессе криоконсервирования и криохранения КТ не выявлено резкого снижения общей концентрации тромбоцитов (Стр.). Предложенный морфофункциональный метод оценки тромбоцитом показал, что концентрация тромбоцитов с гранулами, МФАТ и ААТ до криоконсервирования составили соответственно  $1,2\pm 0,4 \cdot 10^{12}/\text{л}$ ,  $50,6\pm 4,5$  и  $58,5\pm 6,1$  баллов. После криоконсервирования в течение 7-10 суток Стр.гр., МФАТ и ААТ достоверно ( $p < 0,05$ ) снижались и составляли соответственно  $0,6\pm 0,2 \cdot 10^{12}/\text{л}$ ,  $40,9\pm 5,7$  и  $37,5\pm 5,9$  баллов. Сохранность количества тромбоцитов с гранулами варьировала от 30 до 60%, составляя в среднем 45%. Необходимо особо подчеркнуть, что наилучшая сохранность тромбоцитов с гранулами (60% от их количества до криоконсервирования) отмечена в КТ исходно содержавших более 30% тромбоцитов богатых гранулами (ТБГ). В КТ, содержавших менее 20% ТБГ, сохранность функциональной полноценных тромбоцитов не превышала 30%.

Таким образом, разработанный метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью витального окрашивания позволяет оценить биологическую полноценность тромбоцитов КТ на разных этапах хранения, независимо от концентрации клеток. Это указывает на перспективность использования данного метода для оценки качества тромбоцитов КТ в производственной трансфузиологии, в т.ч. для оценки качества криоконсервированных тромбоцитов.

Таблица 5  
Морфофункциональные параметры тромбоцитов  
в аферезных и пулированных КТ

Морфофункциональные параметры тромбоцитов	Аферезные КТ(N=50)	Пулированные КТ (N=50)
<b>Концентрация тромбоцитов, <math>10^{12}/л</math></b> M ± σ пределы	2,01 ±0,5 1-2,5	5,8±2,1* 2-12
<b>Доля тромбоцитов с гранулами, %</b> M ± σ пределы	54,7±8,7 35-75	45,2±9,4* 20-65
<b>Концентрация тромбоцитов с гранулами, <math>10^{12}/л</math></b> M ± σ пределы	1,1±0,2 0,4-2	2,6±0,8* 0,4-6
<b>МФАТ, баллы</b> M ± σ пределы	47,5±6,1 37-62	42,7±7,4 30-58
<b>ААТ, баллы</b> M ± σ пределы	54,0±8,2 30-75	44,0±10,1* 15-65
<b>МФСТ, баллы</b> M ± σ пределы	100,6±17,8 67-137	82,5±20,7* 45-123
* p<0,05		

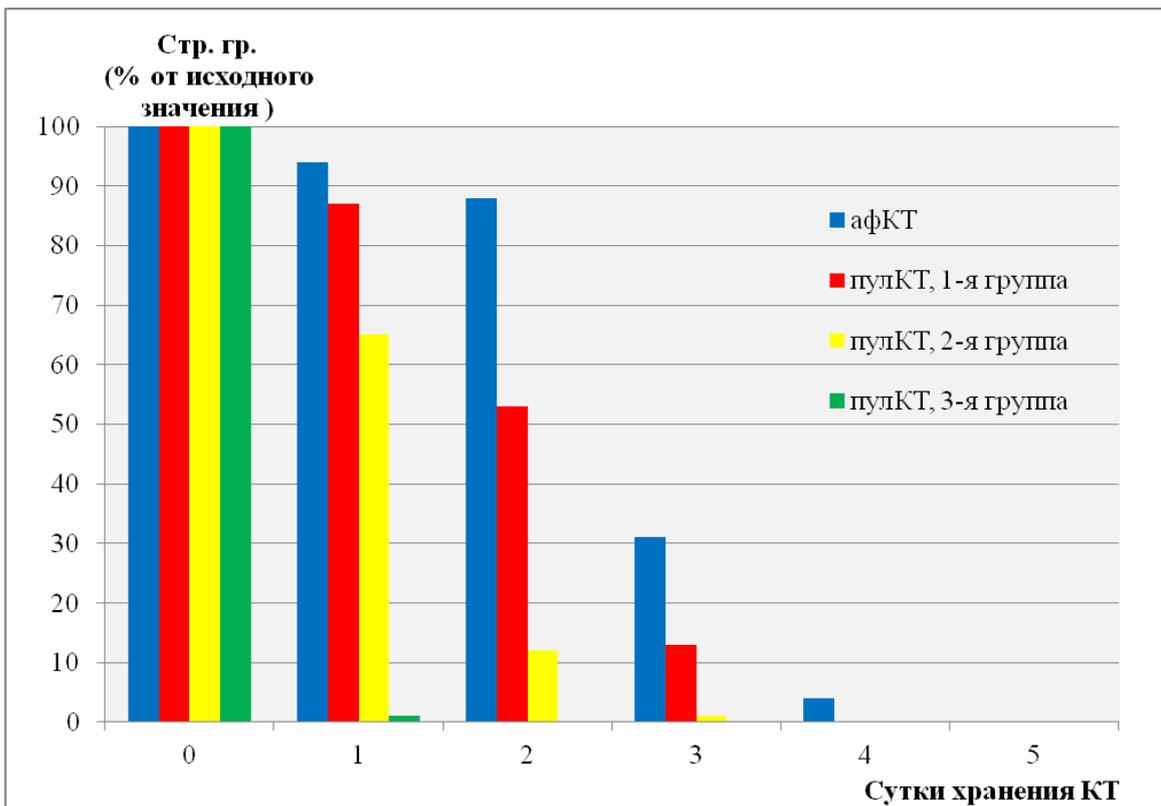


Рисунок 25. Концентрации тромбоцитов с гранулами (Стр.гр.) в аферезных и пулированных КТ в процессе хранения при 22°С

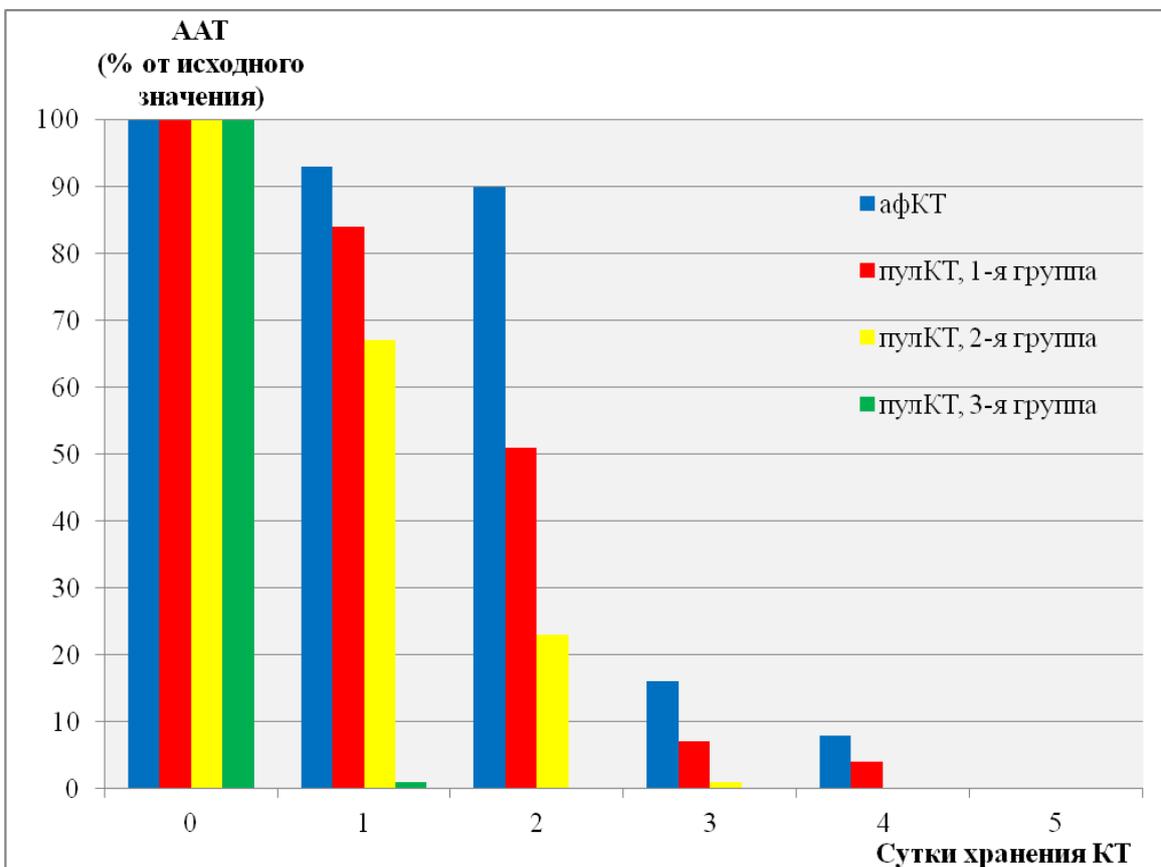


Рисунок 26. Адгезивная активность тромбоцитов (ААТ) в аферезных и пулированных КТ в процессе хранения при 22°

### **5.3. Морфофункциональный анализ тромбоцитов при различных патологических состояниях**

При многих заболеваниях наблюдается нарушение клеточного звена гемостаза, связанное со снижением числа циркулирующих тромбоцитов или потерей их биологической полноценности. В связи с этим проведена апробация разработанного метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов у пациентов с различными патологиями. По морфофункциональному статусу тромбоцитов крови всех пациентов удалось разделить на три большие группы: с нормальным, сниженным и повышенным статусом.

Первую группу составили пациенты с изолированными переломами костей нижних конечностей, с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии, реципиентов почки на 21 день после трансплантации и больных с пороками клапанов сердца. Установлено, что параметры тромбоцитов в этих группа больных составляли: Стр.гр.(100,6-112,5 тыс/мкл), Дтр.гр.(50,8-56,3%), МФАТ(45,3-47,3 баллов), ААТ(50,8-57,3 балла) и значительно не отличались от таковых у доноров крови (табл. 6). Морфофункциональный статус тромбоцитов таких пациентов оценивался как нормальный.

Вторую группу составили пациенты с острыми экзогенными отравлениями, с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери, больные ишемической болезнью сердца после оперативного вмешательства, гематологические больные с острым миелоидным лейкозом без геморрагического и с геморрагическим синдромом. Выявлено достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение Дтр.гр. и Стр.гр. у пациентов с острыми экзогенными отравлениями (в 2,1 и 2,8 раз), с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери (в 2,1 и 2,8 раз) по сравнению с аналогичными параметрами у доноров. Следует отметить, что у пациентов с абдоминальной травмой, осложненной массивной кровопотерей, требовалась коррекция клеточного звена гемостаза. Для этого интраоперационно с учетом объема учтенной кровопотери таким пациентам осуществляли внутривенное введение 0,5-1,5

дозы КТ с функционально полноценными тромбоцитами (Дтр.гр.=60%). Непосредственно после проведения клеточной трансфузионной терапии Стр.гр. увеличилось в среднем в 2,4 раза, Дтр.гр.– в 1,3 раз (табл. 6).

У больных ишемической болезнью сердца после оперативного вмешательства снижение Дтр.гр. и Стр.гр. составляло 8,0 и 9,1 раз, у гематологических больных с острым миелоидным лейкозом без геморрагического синдрома – соответственно 1,8 и 13,2 раз по сравнению с донорами. У гематологических больных острым миелоидным лейкозом с геморрагическим синдромом II-III степени выявлен крайне низкий уровень Дтр.гр. и Стр.гр. в крови –  $5,4 \pm 2,6\%$  и  $0,8 \pm 0,13$  тыс/мкл, что в 10,7 и 138 раз ниже нормы (табл. 6).

МФАТ и ААТ также были достоверно снижены ( $p < 0,01$ ) у больных второй группы. Наиболее выраженное подавление адгезивной активности тромбоцитов отмечено у больных ишемической болезнью сердца после оперативного вмешательства (ААТ= $5,3 \pm 1,6$  баллов, снижение в 10,6 раз) и у гематологических больных с ГС II-III степени (ААТ= $1,5 \pm 0,9$  баллов, снижение в 37,7 раза) по сравнению с нормой. Особо отметим, что у 20 из 40 обследованных гематологических больных с ГС II-III степени ААТ на стекле полностью отсутствовала (табл. 6). Морфологическое исследование тромбоцитов гематологических больных с ГС II-III степени показало, что практически вся популяция циркулирующих клеток таких больных имеет очень низкую интенсивность свечения (рис. 27). Это вызвано как дефектами цитоплазмы тромбоцитов, так и отсутствием в них гранул. У гематологических больных без ГС эти структурно-функциональные нарушения тромбоцитов были выражены гораздо слабее (табл. 6, рис. 27).

Третью группу составили больные с тромбозами вен печени, у которых был повышен морфофункциональный статус тромбоцитов. Это выразилось в достоверном ( $p < 0,05$ ) повышении морфофункциональных параметров клеток: Дтр.гр. – до  $88,5 \pm 2,9\%$ , Стр.гр. – до  $503,5 \pm 25,4$  тыс/мкл, МФАТ – до  $60,2 \pm 4,5$

баллов, ААТ – до  $87,5 \pm 2,5$  баллов, что превышало аналогичные параметры у доноров соответственно в 1,5, 4,5, 1,2 и 1,5 раза. При этом в тромбоцитах этих больных выявлено заметно увеличено количество гранул на 1 клетку. Если у доноров содержание гранул на 1 клетку составляло в среднем 8,5 гранулы, то у больных с тромбозами – 16,9 гранулы. Этот эффект может быть вызван гиперактивацией тромбоцитов в ходе тромбоза.

Таким образом, анализ МФСТ с помощью витального окрашивания может быть использован в клинико-диагностической практике для оценки биологической полноценности тромбоцитов пациента.

Таблица 6

## Морфофункциональные параметры тромбоцитов человека в норме и патологии

Исследуемые группы	Анализируемые параметры тромбоцитов человека			
	Стр.гр., тыс/мкл M ± σ	Дтр.гр. %, M ± σ	МФАТ, баллы M ± σ	ААТ, баллы M ± σ
Доноры крови, N=300	116,5±18,6	57,6±10,5	48,6±5,2	56,5±12,5
Доноры органов, N=15	10,6±4,5*	14,8±5,9*	31,1±4,3*	15,5±10,2*
Пациенты с изолированными переломами костей конечностей, N=40	112,5±21,5	56,3±12,1	47,3±9,2	57,3±11,2
Пациенты с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии, N=20	106,4±34,1	55,1±9,7	46,0±8,5	54,1±9,2
Реципиенты почки на 21 сутки после трансплантации, N=10	100,6±18,1	50,8±8,7	45,3±8,2	50,8±8,7
Гематологические больные острым миелоидным лейкозом без геморрагического синдрома, N=60	9,5±3,6*	34,0±14,9*	38,6±8,1*	33,8±15,6*
Гематологические больные острым миелоидным лейкозом с тромбоцитопеническим геморрагическим синдромом II-III степени, N=40	0,8±0,13*	5,4±2,6*	20,1±2,9*	1,5±0,9*
Пациенты с острыми экзогенными отравлениями, N=50	40,4±12,3*	28,4±8,6*	30,4±6,8*	22,4±8,2*
Пациенты с абдоминальной травмой на высоте массивной кровопотери, N=20	16,9±4,5*	28,9±8,8*	29,4±4,5*	26,9±10,2*
Пациенты с абдоминальной травмой непосредственно после проведения трансфузионной терапии, N=20	41,2±10,5*	38,1±12,3*	36,0±6,3*	36,4±12,8*
Больные ишемической болезнью сердца через 2 часа после оперативного вмешательства, N=10	12,3±2,6*	7,9±1,8*	26,1±2,3*	5,3±1,6*
Больные с пороками клапанов сердца через 2 часа после оперативного вмешательства N=20	99,7±20,8	57,8±5,3	44,8±12,1	51,8±5,3
Больные с тромбозами вен печени, N=10	503,5±25,4*	88,5±2,9*	60,2±4,5*	87,5±2,5*
*достоверно относительно доноров крови при p<0,01				

#### **5.4. Прогнозирование развития геморрагического синдрома у гематологических больных с тромбоцитопенией.**

Прогнозирование ГС проводят на основе суммарной оценки количества тромбоцитов и уровня активности факторов протромбинового комплекса в крови [29], а также балльной оценки полиорганной дисфункции [28]. Однако, при таком подходе не проводится анализ морфофункциональных свойств циркулирующих тромбоцитов больного. Доказано, что нарушение структуры и функций тромбоцитов является одной из основных причин развития ГС у пациентов с тромбоцитопенией [6,27,31,54], что обосновывает необходимость исследования морфофункционального статуса тромбоцитов таких пациентов.

Взаимосвязь между морфофункциональными параметрами тромбоцитов гематологических больных и наличием выраженного ГС оценивали на основе коэффициента ранговой корреляции Спирмена (G) при  $p < 0,01$ . Тесная корреляционная взаимосвязь доказана между наличием ГС с одной стороны и Дтр.гр. (G=0,87), Стр.гр. (G=0,9), ААТ (G=0,9), МФАТ (G=0,91) и МФСТ (G=0,91). В то же время взаимосвязь между наличием ГС и общей концентрации тромбоцитов в крови (Стр.) была слабо выраженной (G=0,21). Последнее указывает на то, что использование только концентрации тромбоцитов крови больных в качестве прогнозирующего ГС параметра не является объективным. В этой связи проведено ранжирование структурно-функциональных параметров тромбоцитов у гематологических больных для прогнозирования развития выраженного геморрагического синдрома.

Основными параметрами для прогнозирования выбраны: адгезивная активность тромбоцитов (ААТ), относительное содержание тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр., %) при общей концентрации клеток от 2 до 50 тыс/мкл, морфофункциональный статус тромбоцитов (МФСТ). Результаты исследования отражены в табл. 7. Использование этих параметров позволило в 90-97% случаев объективно оценить возможность развития выраженного кровотечения на фоне тромбоцитопении.

Снижение концентрации тромбоцитов в крови (Стр. – менее 20 тыс/мкл) в крови больного не всегда приводит к развитию выраженного ГС. Так, среди обследованных 60 гематологических больных без ГС у 16 человек концентрация тромбоцитов (Стр.) варьировала от 8 до 19 тыс/мкл. Однако при этом, структурно-функциональные параметры циркулирующих клеток у этих больных были либо нормальными, либо умеренно сниженными (ААТ – 25-60 баллов, Дтр.гр. – 30-60%, МФСТ – 60-90 баллов). С другой стороны, выраженный ГС II-III степени наблюдался у 10 больных с концентрацией тромбоцитов от 35 до 50 тыс/мкл, при этом структурно-функциональные параметры циркулирующих клеток у этих больных имели очень низкие значения ААТ (0 баллов), Дтр.гр. (0-5%) и МФСТ (10-30 баллов). Отметим, что при низких значениях ААТ, Дтр.гр. и МФСТ проведение трансфузии концентратов тромбоцитов обосновано даже в отсутствие выраженной тромбоцитопении (Стр.>50 тыс/мкл). Следовательно, развитие геморрагического синдрома в значительной степени связано с нарушением структуры и функций циркулирующих тромбоцитов.

Таким образом, предложенный метод прогнозирования развития ГС с помощью морфофункционального флуоресцентного анализа витально окрашенных клеток является объективным и может быть использован для оценки вероятности развития ГС при тромбоцитопении, а также коррекции проводимой клеточной трансфузионной терапии.

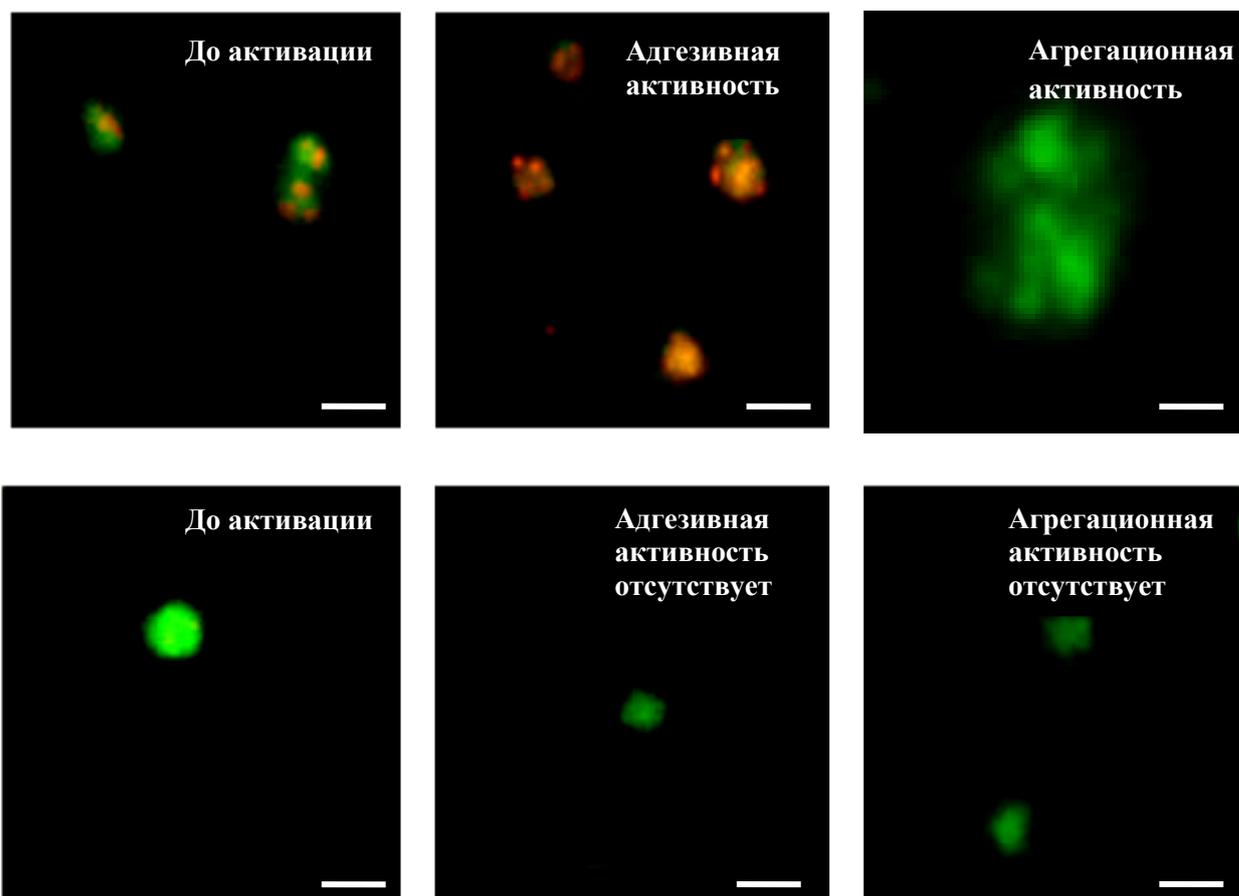


Рисунок 27. Витально окрашенные трипафлавином-АО тромбоцитов гематологических больных с тромбоцитопенией без геморрагического синдрома (верхний ряд) и с геморрагическим синдромом II-III степени (нижний ряд). Масштабная линия – 5 мкм

Таблица 7.

Частота развития ГС II-III степени у гематологических больных с тромбоцитопенией в зависимости от параметров витально окрашенных тромбоцитов

Морфофункциональные параметры тромбоцитов		Частота развития ГС (%)
ААТ (баллы)	Менее 4	90
*Дтр.гр. (%)	Менее 10	90
МФСТ (баллы)	Менее 30	95
Σ параметров		97
* Концентрация тромбоцитов в крови варьировала от 2 до 50 тыс/мкл		

## **5.5. Влияние процедуры ИК на морфофункциональный статус тромбоцитов крови.**

Процедура искусственного кровообращения активно применяется в кардиологии и кардиохирургии для замены насосной функции сердца и газообменной функции легких механическими устройствами на непродолжительное время [12,22]. После операций с искусственным кровообращением нередко наблюдается нарушение свертывания крови, наиболее частыми причинами его могут быть неадекватная нейтрализация гепарина, дефибринация плазмы и разрушение тромбоцитов [63,91]. Изменение структуры и функции тромбоцитов во время ИК может играть существенную роль в развитии послеоперационной геморрагии [65,121]. Для предотвращения возможных осложнений у больных, перенесших процедуру ИК, проводят оценку системы гемостаза с помощью методов тромбоэластографии и агрегометрии [29,76,115,117]. Однако ни один из этих методов не является универсальным, т.к. их эффективность сильно зависит от формы кардиопатологии больного и проводимой предоперационной терапии [65,71]. Кроме того, методы тромбоэластографии и агрегометрии не позволяют избирательно оценивать качество тромбоцитов, циркулирующих в крови больного [29]. Оценка качества тромбоцитов должна включать определение их биологической полноценности и функциональной активности. В этой связи проведена исследование влияния процедуры ИК на биологическую полноценность тромбоцитов кардиохирургических больных с помощью предложенного метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов.

Обследовали 40 кардиохирургических больных, из них 18 человек (5 женщин и 13 мужчин) в возрасте  $57,5 \pm 2,6$  лет с ишемической болезнью сердца, ИБС (1-я группа) и 22 человека (7 женщин и 15 мужчин) в возрасте  $56,1 \pm 2,3$  лет с пороком аортального или митрального клапана (2-я группа). Забор проб крови для морфофункционального исследования тромбоцитов выполняли перед началом оперативного вмешательства (этап вводного

наркоза до гепаринизации) и в конце операции (инактивация гепарина протамина сульфатом во время остеосинтеза грудины).

Больных оперировали в условиях комбинированной общей анестезии (фентанил, мидазолам, пропофол, севофлуран). Больным с ИБС (1-я группа) выполняли шунтирование  $2,5 \pm 0,08$  коронарных артерий, больным с пороками клапанов (2-я группа) выполняли протезирования аортального или митрального клапана. Длительность ИК составила  $110,5 \pm 5,6$  мин у больных с ИБС и  $109,2 \pm 6,1$  мин у больных с пороками клапанов. Объем учтенной кровопотери составил  $1725 \pm 150$  мл у больных с ИБС и  $1587 \pm 96$  мл у больных с пороками клапанов. ИК с использованием мембранных оксигенаторов проводили в пульсирующем режиме с перфузионным индексом  $2,2-2,4$  л/мин/м<sup>2</sup> в условиях умеренной гипотермии (30-34°C).

Установлено, что до начала процедуры ИК значимых различий между всеми морфофункциональными параметрами тромбоцитов крови кардиохирургических больных 2-х анализируемых групп не наблюдалось (табл. 8). При этом значения морфофункциональных параметров тромбоцитов и агрегационной активности, соответствующие норме у 14 человек из 18 в 1-й группе (77,7%) и у 18 человек из 22 (81,8%) во 2-й группе.

После процедуры ИК у обследованных больных наблюдалось снижение общей концентрации тромбоцитов: у больных 1-группы концентрация тромбоцитов снизилась в среднем в 1,57, у больных 2-й группы – в 1,59 раза, т.е. в обеих группах наблюдалось одинаковое уменьшение концентрации тромбоцитов в крови. Однако, концентрация тромбоцитов с гранулами (Стр.гр.) у больных 1-группы снизилась в 2,5 раза, агрегационная активность тромбоцитов – в 2,6 раза, тогда как у больных 2-й группы уменьшение Стр.гр и агрегационная активность было менее выраженным - в 1,9 и 2 раза (табл.8). МФАТ у больных 2-й группы после процедуры ИК составила  $48,5 \pm 6,6$  баллов, ААТ –  $57,7 \pm 4,8$  баллов, МФСТ –  $115,1 \pm 6,4$  баллов, что соответствовало норме. Напротив, у больных 1-й группы МФАТ, ААТ и МФСТ были достоверно

( $p < 0,01$ ) снижены, составляя соответственно  $35,6 \pm 9,1$ ,  $31,5 \pm 11,7$  и  $67,1 \pm 10,5$  баллов. В целом, после ИК нормальный морфофункциональный статус тромбоцитов отмечен у 7 человек из 18 в 1-й группе (38%), и у 18 человек из 22 во 2-й группе (81%). Послеоперационное кровотечение наблюдалось у 4 больных 1-й группы и не наблюдалось у больных 2-й группы, причем во всех случаях послеоперационное кровотечение сочеталось с очень низкими морфофункциональными параметрами тромбоцитов. Так, у больных с послеоперационным кровотечением Стр.гр. составило  $10,1 \pm 5,1$  тыс/мкл, МФАТ –  $27,6 \pm 1,1$  баллов, ААТ –  $7,3 \pm 2,5$  баллов, МФСТ –  $36,0 \pm 3,6$  (баллов, агрегационная активность –  $5,5 \pm 0,25$  Ом\*мин. Следовательно, при послеоперационных кровотечениях тромбоциты имеют очень низкую биологическую полноценность.

У больных обеих групп не было выявлено достоверной корреляционной связи между продолжительностью ИК и морфофункциональными параметрами тромбоцитов: Стр.гр. ( $r = -0,286$  в 1-й группе и  $r = -0,098$  во 2-й группе), МФАТ ( $r = -0,132$  в 1-й группе и  $r = -0,102$  во 2-й группе), ААТ ( $r = -0,238$  в 1-й группе и  $r = -0,07$  во 2-й группе) и МФСТ ( $r = -0,168$  в 1-й группе и  $r = -0,112$  во 2-й группе). Вероятно, повреждение тромбоцитов в ходе ИК, зависит не от длительности процедуры ИК, а от типа заболевания, характера проводимой операции и индивидуальных свойств больного.

Проведенный морфофункциональный анализ тромбоцитов больных с ИБС и пороками клапанов показал, что после процедуры ИК при коронарном шунтировании снижение концентрации циркулирующих тромбоцитов сопровождается снижением их морфофункционального статуса, тогда как при протезировании клапанов морфофункциональный статус тромбоцитов сохраняется на фоне снижения их общего количества. При этом морфофункциональные параметры тромбоцитов слабо зависят от продолжительности ИК.

Таблица 8

Морфофункциональные параметры тромбоцитов кардиохирургических больных до и после процедуры ИК.

Морфофункциональные параметры тромбоцитов	Доноры (контроль)	Больные с ИБС (N=18)		Больные с пороками клапанов (N=22)	
		До ИК	После ИК	До ИК	После ИК
Стр., тыс/мкл M ± σ пределы	224,8±19,7 160-370	169,8±18,7 110-320	108,2±17,4* 60-150	155,7±10,4 110-300	97,5±10,8* 50-140
Дтр.гр., % M ± σ пределы	57,6±10,5 35-75	50,5±7,8 10-80	32,5±10,8* 5-80	52,1±5,3 15-80	57,8±6,5 10-85
Стр.гр., тыс/мкл M ± σ пределы	116,5±18,6 60-190	97,5±13,4 30-120	38,7±18,4* 5-100	95,9±8,0 30-115	50,1±6,5* 20-110
МФАТ, баллы M ± σ пределы	48,6±5,2 37-60	44,0±9,2 28-65	35,6±9,1* 26-53	44,8±7,1 29-62	48,5±6,6 29-60
ААТ, баллы M ± σ пределы	56,5±12,5 35-75	48,6±7,8 10-80	31,5±11,7* 0-80	51,8±5,3 10-80	57,7±4,8 15-85
МФСТ, баллы M ± σ пределы	109,1±11,5 85-130	93,6±5,4 38-145	67,1±10,5* 26-143	96,5±6,7 39-135	115,1±6,4 39-130
Агрегационная активность, Ом*мин (индуктор-2мкг коллагена) M ± σ пределы	59,8±6,5 30-80	58,2±4,5 30-76	22,5±8,6* 5-60	56,5±3,7 32-75	27,8±3,8* 10-60
* p<0.01 относительно значений до ИК					

## **5.6. Влияние антиагрегантов на морфофункциональный статус тромбоцитов человека**

В настоящее время распространено использование антитромбоцитарных препаратов (антиагрегантов) для коррекции системы клеточного гемостаза в клинической практике [60,65]. Антиагреганты подразделяют на препараты прямого (аспирин, тикагрелор, эптифибатид) и непрямого действия (клопидогрель, прасугрель), назначение препарата определяется типом заболевания и тактикой лечения [70,95]. Под действием антиагрегантов тромбоциты циркулирующей крови теряют способность к адгезии и агрегации. Изменение активности тромбоцитов под действием одного и того же антиагреганта у разных людей имеет широкую вариабельность – так, оценка числа пациентов, резистентных к клопидогрелю, колеблется от 4 до 40% [45]. Оценку эффективности воздействия препаратов на тромбоциты исследуют с помощью оптической агрегометрии [60,65]. Однако, методы оптической агрегометрии трудно стандартизировать, отсутствуют четкие критерии, определяющие степень воздействия антиагреганта на тромбоциты, не проводится анализ биологической полноценности тромбоцитов. В связи с этим нами предложена морфофункциональная оценка статуса тромбоцитов крови в присутствии антиагрегантов непрямого (клопидогрель) прямого (тикагрелор) действия.

Обследовали 10 больных с острым коронарным синдромом на фоне ИБС, принимавших клопидогрель. Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили до назначения препарата, через 6 и 24 часа после приема нагрузочной дозы 600 мг и на 7-е сутки на фоне приема поддерживающей дозы клопидогрель - 75 мг в сутки.

У всех больных, принимавших клопидогрель, наблюдалось достоверное снижение адгезивной активности тромбоцитов и морфофункционального статуса тромбоцитов (табл. 9). Так, ААТ и МФСТ через 6 часов после приема клопидогреля составили  $36,3 \pm 12,5$  и  $89,3 \pm 11,6$  баллов, через 24 часа –  $20,5 \pm 11,5$

и  $70,4 \pm 11,2$  баллов, через 7 суток –  $49,6 \pm 9,4$  и  $99,1 \pm 10,1$  баллов ( $p < 0,01$ ), тогда как до назначения препарата ААТ и МФСТ составляли  $54,3 \pm 9,7$  и  $103,4 \pm 10,4$  баллов. При этом концентрация тромбоцитов с гранулами (Стр.гр.) и морфофункциональная активность тромбоцитов (МФАТ) не претерпевали существенных изменений (табл. 9). Последнее объясняется тем, что под действием клопидогреля наблюдалось снижение функциональной активности тромбоцитов при сохранении общего количества функционально полноценных клеток и их структурной целостности. У всех больных максимальное падение ААТ отмечено через 24 часа после приема клопидогреля по сравнению с ААТ у этих же больных до назначения препарата. Отметим, что степень снижения ААТ у больных варьировало от 1,5 до 9 раз. Широкая вариабельность ААТ на стадии максимального действия клопидогреля может быть связана с разной чувствительностью больных к данному препарату.

Таблица 9

Морфофункциональные параметры тромбоцитов больных с острым коронарным синдромом на фоне ИБС, принимавших клопидогрель (N=10)

Морфофункциональные параметры	Время после приема нагрузочной дозы клопидогреля 600 мг			
	0 часов	6 часов	24 часа	7 суток
Стр.гр., тыс/мкл M ± σ пределы	$110,7 \pm 12,1$ 80-200	$109,1 \pm 10,6$ 79-200	$107,8 \pm 11,8$ 76-205	$112,6 \pm 9,7$ 85-203
МФАТ, баллы M ± σ пределы	$47,6 \pm 5,4$ 40-60	$47,2 \pm 5,2$ 40-60	$47,1 \pm 5,2$ 40-60	$48,0 \pm 5,3$ 40-60
ААТ, баллы M ± σ пределы	$54,3 \pm 9,7$ 40-70	$36,3 \pm 12,5^*$ 30-50	$20,5 \pm 11,5^*$ 5-30	$49,6 \pm 9,4$ 35-70
МФСТ, баллы M ± σ пределы	$103,4 \pm 10,4$ 85-120	$89,3 \pm 11,6^*$ 70-105	$70,4 \pm 11,2^*$ 46-79	$99,1 \pm 10,1$ 85-115
* $p < 0,01$ - относительно значений до приема нагрузочной дозы клопидогреля				

С помощью разработанного метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов *in vitro* исследована чувствительность этих клеток к воздействию антиагреганта прямого действия (тикагрелор) у доноров крови и больных с острым коронарным синдромом на фоне ИБС. Для этого приготавливали раствор официального препарата тикагрелора в конечной концентрации, которая присутствует в крови больных, получавших этот антиагрегант. 1 таблетку препарата растворяли в 400 мл 0,9% NaCl при 37°C, затем смешивали 100 мкл полученного раствора тикагрелора с 1 мл крови донора или больного, смесь выдерживали при 22°C в течение 60 мин, после чего проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов. Разработаны параметры оценки чувствительности тромбоцитов крови к воздействию тикагрелора:

- соотношение основных морфологических типов тромбоцитов – дискоциты, большие округлые, отросчатые, и дегенеративные клетки;
- Дтр.гр. – содержание тромбоцитов с гранулами (%);
- Тр.отр-1 – содержание отросчатых тромбоцитов (%) до начала адгезии;
- Тр.отр-2 – содержание отросчатых тромбоцитов (%) через 25 минут экспозиции витально окрашенных клеток на стекле при 37°C в присутствии тикагрелора;
- коэффициент ЧТТ – чувствительность тромбоцитов крови к тикагрелору. Он отражает долю тромбоцитов с гранулами, способных превратиться в отросчатые клетки в ходе индуцированной адгезии на стекле в присутствии тикагрелора. ЧТТ рассчитывают по формуле:

**ЧТТ = (Тр.отр-2 – Тр.отр-1) : Дтр.гр.** Коэффициент ЧТТ может варьировать от 0 (при Тр.отр-2 = Тр.отр-1) до 1 (при Тр.отр-2 – Тр.отр-1 = Дтр.гр.).

В процессе исследования отобраны доноры и больные с острым коронарным синдромом на фоне ИБС, имеющие одинаковое содержание

тромбоцитов с гранулами в циркулирующей крови (Dтр.гр.=60-65%). Установлено, что соотношение основных морфологических типов тромбоцитов у доноров и больных с острым коронарным синдромом было сходным и составляло: дискоциты – 63-67%, большие округлые тромбоциты – 18-22%, отросчатые тромбоциты – 8-12%, дегенеративные тромбоциты – 3-7%. У обследованных это соотношение менялось в процессе адгезии клеток на стекле – в течение 5-15 мин при 37°C тромбоциты с гранулами распластывались на предметном стекле, что сопровождалось постепенным смещением гранул к периферии клеток. Выявлено заметное увеличение содержания больших округлых клеток – до 70-75%, тогда как доля дискоцитов снизилась до 10-15% (рис. 28). Через 16-20 минут содержание больших округлых тромбоцитов стало постепенно уменьшаться. При этом наблюдали дегрануляцию распластанных тромбоцитов (выброс гранул из клеток) и образование у них многочисленных отростков. Через 25 мин процесс адгезии тромбоцитов на стекле завершался, при этом соотношение морфофункциональных типов тромбоцитов было следующим: дискоцитов – 10-15%, больших округлых тромбоцитов – 10-12%, отросчатых тромбоцитов – 70-72%, дегенеративных тромбоцитов – 3-7% (рис. 28). Среди тромбоцитов содержание функционально пригодных клеток (тромбоцитов с гранулами) не превышало 1%. Таким образом, 5-15 минутную (в среднем 10 мин) экспозицию клеток на предметном стекле при 37°C можно рассматривать как время начала адгезии тромбоцитов, 25 мин – время окончания адгезии тромбоцитов. На основании этих данных мы обозначили 3 стадии динамики адгезии тромбоцитов: стадия 0 (до начала адгезии), стадия 1 – начало адгезии - распластывание тромбоцитов без дегрануляции (10 мин), стадия 2 – конец адгезии – дегрануляция тромбоцитов и образование ими отростков (25 мин). Тромбоциты, достигшие стадии 2, являются необратимо активированными клетками.

Исследовали динамику адгезии тромбоцитов доноров крови на стекле в присутствии тикагрелора. Через 25 мин у 19 доноров из 30 все тромбоциты с

гранулами (клетки, способные к адгезии) находились на стадии 0-1. Значение Dтр.гр. составляло 60-65%, т.е. в этих образцах крови адгезивная активность тромбоцитов на стекле практически отсутствовала (рис. 29). У 11 доноров через 25 мин часть тромбоцитов с гранулами достигала в ходе адгезии стадии 2 (дегрануляция клеток и образование ими отростков), значения Dтр.гр. варьировали от 10 до 60%, т.е. в этих образцах крови адгезивная активность тромбоцитов на стекле частично сохранялась.

Содержание отростчатых тромбоцитов до начала адгезии (Тр.отр-1) в крови обследованных 30 доноров составляло 8-12%. У 19 доноров из 30 содержание отростчатых тромбоцитов через 25 минут при 37°C в присутствии тикагрелора (Тр.отр-2) составило 8-13%, т.е. не изменилось. У 11 пациентов Тр.отр-2 варьировало от 15 до 60%. Высокую вариабельность Тр.отр-2 можно связать с неодинаковой адгезивной активностью тромбоцитов с гранулами в присутствии тикагрелора у доноров, обусловленную разной чувствительностью тромбоцитов к антиагреганту.

Предложено чувствительность тромбоцитов крови к тикагрелору оценивать с помощью коэффициента ЧТТ, который отражает долю функционально пригодных клеток, способных в присутствии тикагрелора доходить до стадии 2 (дегрануляция клеток на стекле и формирование ими отростков). На основании этого предложена классификация степени чувствительности тромбоцитов к тикагрелору: при значениях ЧТТ=0-0,09 чувствительность тромбоцитов к тикагрелору считается высокой, при 0,1-0,3 – средней, при 0,31-0,5 – сниженной, при >0,5 – низкой (табл.10).

Распределение доноров по коэффициенту ЧТТ было следующим: у 23-ти человек чувствительность тромбоцитов к тикагрелору была высокой, у 3-х человек – средней, у 2-х человек – сниженной, и у 2-х – низкой. У больных с острым коронарным синдромом отмечено сходное с донорами крови распределение по коэффициенту ЧТТ (табл. 10). Таким образом, как у доноров крови, так и у больных с острым коронарным синдромом наблюдалась явная

неоднородность по чувствительности циркулирующих тромбоцитов к тикагрелору.

Низкая и сниженная чувствительность тромбоцитов к тикагрелору выявлена у 13-14% обследованных доноров и больных с острым коронарным синдромом. Это указывает, что применение тикагрелора у таких людей будет малоэффективным. Отметим, что у 75% обследованных доноров и больных с острым коронарным синдромом тромбоциты обладали высокой чувствительностью к тикагрелору, что подтверждает терапевтическую обоснованность широкого применения этого препарата.

Таблица 10

Характеристика чувствительности тромбоцитов к тикагрелору у доноров крови и больных с острым коронарным синдромом

Коэффициент ЧТТ	Степень чувствительности тромбоцитов	Распределение:			
		доноров крови (N=30)		больных с острым коронарным синдромом (N=30)	
		Количество	%	Количество	%
0-0,09	высокая	23	76,6%	22	73,3%
0,10-0,30	средняя	3	10,0%	4	13,3%
0,31-0,50	сниженная	2	6,7%	3	10,0%
>0,5	низкая	2	6,7%	1	3,4%

Таким образом, разработанный способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания может быть использован для оценки чувствительности тромбоцитов крови к антиагрегантам как прямого, так и непрямого действия.

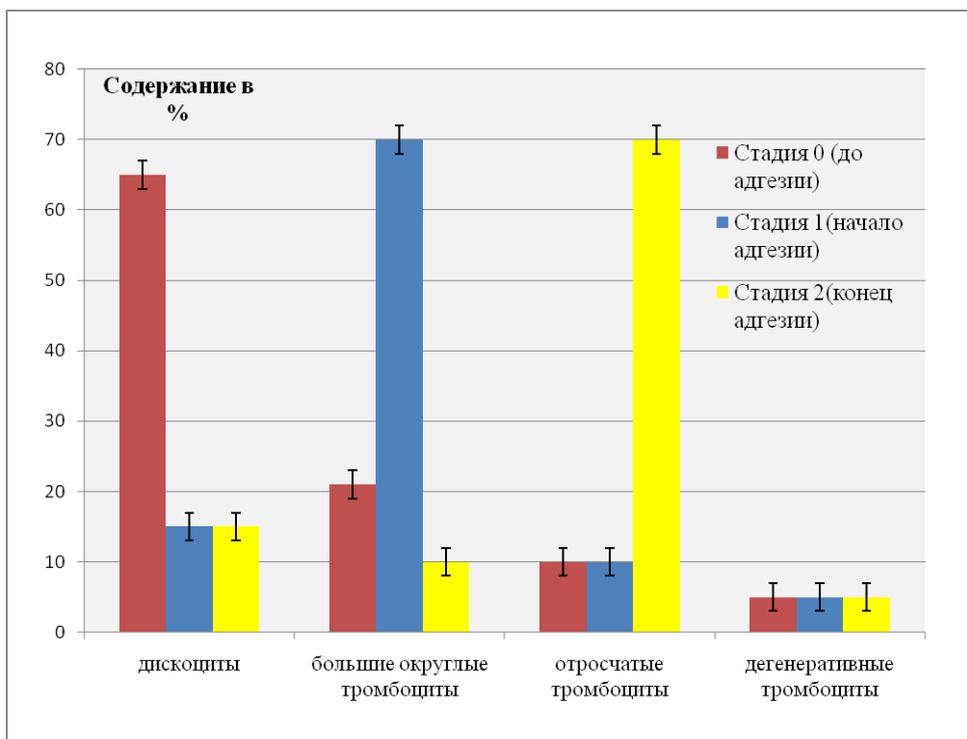


Рисунок 28. Соотношение различных морфологических типов тромбоцитов в исходной крови доноров до адгезии, в начале и в конце адгезии.

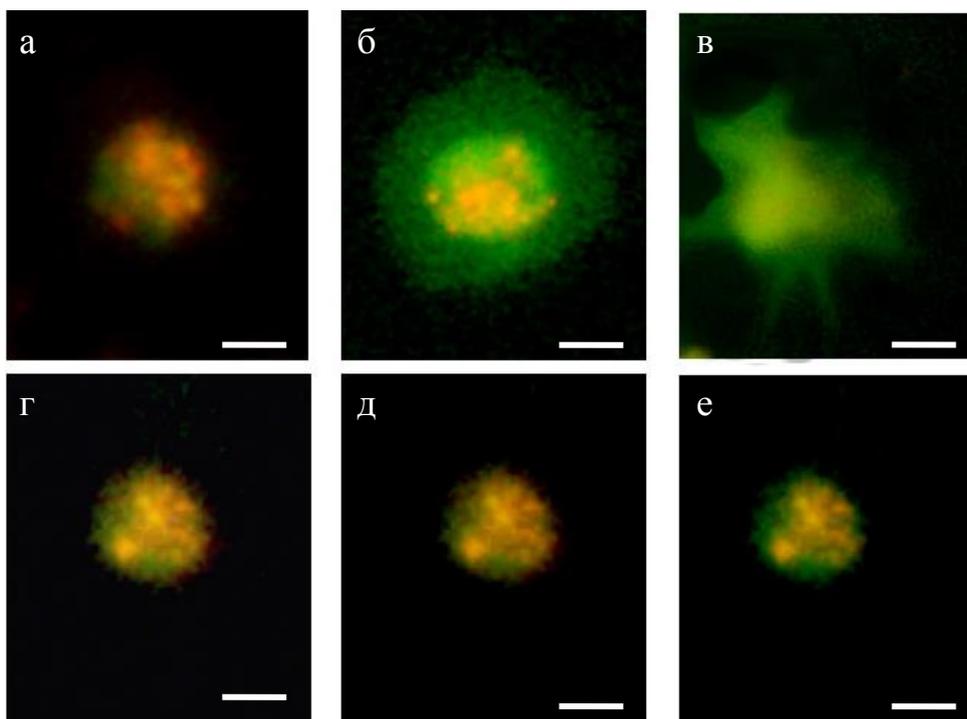


Рисунок 29. Морфологии тромбоцитов доноров крови на разных этапах адгезии на стекле при 37°C.

Верхний ряд – тромбоциты без тикагрелора, нижний ряд – тромбоциты в присутствии тикагрелора.. а, г – до начала адгезии (стадия 0); б, д – через 10 мин при 37°C (стадия 1, начало адгезии); в, е – через 25 мин при 37°C (стадия 2, конец адгезии) Масштабная линия – 3 мкм.

Проведенное морфофункциональное исследование тромбоцитов в норме и патологии показало широкую вариабельность всех предложенных морфофункциональных параметров тромбоцитов как у доноров, так и у пациентов с различными патологиями. Анализ тромбоцитов доноров позволил установить референтные значения этих морфофункциональных параметров, соответствующие норме. Показано, что при различных заболеваниях наблюдается достоверное изменение морфофункциональных параметров тромбоцитов. При кровотечениях количество функционально полноценных тромбоцитов и их морфофункциональный статус резко снижены, при тромбозах – заметно повышены, что позволяет прогнозировать развитие у пациента геморрагических или тромбоэмболических осложнений. С другой стороны, снижение общей концентрации циркулирующих тромбоцитов не всегда сопровождается снижением их биологической полноценности. Оценка морфофункционального статуса тромбоцитов также позволяет оценить воздействие антиагрегантов на биологическую полноценность этих клеток.

Проведенное исследование обусловлено необходимостью разработки и внедрение адекватной оценки биологической полноценности тромбоцитов, используемых в клинической практике [8,13,50-53]. Большинство методов оценки качества тромбоцитов основано на исследовании фиксированных окрашенных клеток с помощью световой [1,3,6], электронной [7,66] и атомно-силовой микроскопии [14], что не позволяет оценить реальную жизнеспособность и функциональную полноценность исследуемых клеток. В клеточной биологии параллельный анализ структурной целостности и функциональной активности клеток часто проводится с использованием витальных красителей. Витальные красители, позволяют выявить определенные внутриклеточные структуры без заметных нарушений их жизнеспособности [41,101]. Такой подход к морфофункциональному анализу клеток признан весьма перспективным, поэтому было решено разработать метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов, основанный на использовании витальных клеточных красителей. В связи с этим на 1-м этапе работы было необходимо разработать метода витального окрашивания тромбоцитов.

Нами предложен витальный краситель на основе флуорохромов триафлавина и акридинового оранжевого, позволяющий дифференциально окрасить цитоплазму и гранулы тромбоциты человека без видимых нарушений их биологической полноценности. Во флуоресцентном микроскопе цитоплазма окрашенных тромбоцитов имеет зеленое свечение, гранулы – красно-оранжевое. Это позволило разработать оригинальный способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека, заключающийся в том, что тромбоциты окрашивают триафлавином-АО, помещают на предметное стекло, анализируют во флуоресцентном микроскопе с учетом их внутреннего состава и интенсивности свечения, после чего препарат с витально окрашенными тромбоцитами экспонируют при 37°C и оценивают адгезивную активность этих клеток.

В ходе исследования витально окрашенных тромбоцитов не выявлено заметного снижения жизнеспособности этих клеток. Так, индуцированная коллагеном или 5мкМ АДФ агрегационная активность витально окрашенных тромбоцитов доноров ( $60,7 \pm 7,3$  Ом\*мин и  $77,5 \pm 6,8\%$ ) достоверно не отличалась от таковой у неокрашенных тромбоцитов ( $62,4 \pm 7,7$  Ом\*мин и  $78,0 \pm 7,1\%$ ) тех же доноров. Также установлено, что витальное окрашивание трипафлавином-АО не вызывает видимых нарушений структуры тромбоцитов и фибробластов человека в течение длительного периода (1-3 суток). Следовательно, использование разработанного метода витального окрашивания обеспечивает сохранение биологической полноценности тромбоцитов.

Разработанный способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов является оригинальным, что подтверждено патентом РФ на изобретение №2485502 от 20.06.2013. Существует ряд методов оценки морфофункционального статуса тромбоцитов на основе морфометрического исследования нефиксированных клеток [4,24], однако при этом отсутствует анализ функций исследуемых тромбоцитов и оценка целостности внутреннего состава исследуемых тромбоцитов, а для проведения исследования требуется дорогостоящая и уникальная микроскопическая аппаратура. Главным недостатком этих методов является отсутствие четкого критерия для различения биологически полноценных и неполноценных тромбоцитов.

В качестве такого критерия было предложено оценивать содержание в витально окрашенных тромбоцитах гранул. Известно, что гранулы (секреторные везикулы) являются неотъемлемым компонентом биологически полноценных тромбоцитов [6,31,75], а их отсутствие приводит к различным тромбоцитопатиям [107,123]. Методы морфометрии фиксированных тромбоцитов включают анализ тромбоцитарных гранул (грануломер), однако такой подход к анализу имеет два недостатка: во-первых, исследование проводится на фиксированных, т.е. видоизмененных клетках; во-вторых,

используемые методы окрашивания фиксированных тромбоцитов не позволяют отличить гранулы тромбоцитов от других органелл, в частности, от митохондрий. Методы исследования нефиксированных тромбоцитов с помощью фазово-интерференционной микроскопии или проточной цитометрии не включают анализ гранул тромбоцитов или позволяют лишь косвенно оценить их наличие в клетке [78,80,82]. Поэтому выявление гранул в составе тромбоцитов с помощью трипафлавина-АО позволило объективизировать оценку структурной целостности тромбоцитов. Преимуществами разработанного метода является возможность параллельного анализа структуры и функций тромбоцитов, отсутствие ограничений по концентрации клеток в пробе, возможность анализа тромбоцитов на оптически плотных субстратах, относительная быстрота проведения анализа (40-60 мин), не требующая уникальной микроскопической аппаратуры. Это указывает на возможность широкого использования разработанного метода.

Для качественной и количественной характеристики витально окрашенных тромбоцитов и оценки их морфофункционального статуса были предложены следующие параметры: концентрация тромбоцитов, Стр.(тыс/мкл); относительное содержание тромбоцитов с гранулами, Дтр.гр.(%); концентрация тромбоцитов с гранулами, Стр.гр.(тыс/мкл); морфофункциональная активность, МФАТ (в фут-канделах или баллах); адгезивная активность, ААТ (в % или баллах); морфофункциональный статус тромбоцитов, МФСТ (в баллах). Параметры Стр. и Стр.гр. используются для количественной характеристики популяции биологически полноценных тромбоцитов, Дтр.гр., МФАТ, ААТ и МФСТ – для качественной характеристики биологической полноценности тромбоцитов.

Дтр.гр. отражает содержание в популяции тромбоцитов структурно полноценных клеток, обладающих потенциальной функциональной активностью. Оценка качества популяции тромбоцитов на основе анализа их флуоресценции часто проводят с помощью методов проточной цитометрии

путем автоматического выявления специфических маркеров на поверхности тромбоцитов [61,64,124]. Такой подход позволяет оценить выявить субпопуляцию активированных или дегенеративных клеток[83,88,89], однако не позволяет реально оценить структурную функциональную полноценность тромбоцитов “нормальной” субпопуляции. Напротив, Dтр.гр. позволяет объективно оценить содержание в популяции структурно полноценных и неполноценных клеток. Кроме того, в настоящей работе показано, что оценка содержания тромбоцитов с гранулами в БоТП доноров с помощью проточного сортера MoFlo XDP является эффективной и воспроизводимой – различие между значениями Dтр.гр., оцениваемыми с помощью MoFlo XDP и флуоресцентной микроскопии не превышали 5-7%. Следовательно, имеется возможность оценки содержания тромбоцитов с гранулами с помощью проточной цитометрии.

Стр.гр. отражает концентрацию структурно полноценных тромбоцитов, обладающих потенциальной функциональной активностью. Значение Стр. зависит как от относительного содержания среди них клеток с гранулами (Dтр.гр.), так и от общей концентрации тромбоцитов (Стр.). В циркулирующей крови пациентов значения Стр.гр. могут быть низкими и очень низкими даже при нормальной общей концентрации тромбоцитов.

МФАТ оценивается по интенсивности свечения витально окрашенных клеток и отражает целостность их внутреннего состава, насыщенность мембранными компонентами и содержание гранул на 1 тромбоцит. С учетом того, что оценка МФАТ проводится на витально окрашенных клетках, появляется возможность дальнейшей оценки адгезивной активности (ААТ) этих же клеток. ААТ отражает функциональную полноценность исследуемых тромбоцитов на основе исследования их адгезии на стекле. В ходе адгезии тромбоциты претерпевают значительные изменения, хорошо различимые морфологически – при адгезии происходит распластывание клеток, дегрануляция и формирование отростков – поэтому оценка адгезивной

активности тромбоцитов представлялась особенно удобной для их морфофункционального исследования. В ряде исследований, описывающих адгезивную активность тромбоцитов на различных материалах, применяется витальное окрашивание этих клеток флуорохромными красителями [82,113]. Однако во всех случаях это окрашивание не являлось дифференциальным, т.е. не позволяло оценить внутренний состав тромбоцита, и, соответственно, его дегрануляцию в ходе адгезии, а также не включало оценку содержания адгезивной активных клеток в популяции исследуемых тромбоцитов. Разработанный подход к анализу адгезивной активности тромбоцитов на стекле отражает относительное содержание к популяции клеток, способных к адгезии; однако, он также позволяет оценить их абсолютное содержание (тыс/мкл) в пробе. МФСТ является интегральным параметром, который оценивается по сумме МФАТ и ААТ и отражает биологическую полноценность тромбоцитов.

Анализ крови 300 доноров позволили выявить референтные значения разработанных морфофункциональных параметров тромбоцитов. В норме значения Дтр.гр. варьируют от 35 до 75% ( $M \pm \sigma = 57,6 \pm 10,5$ ), Стр.гр. – от 60 до 190 тыс/мкл ( $M \pm \sigma = 116,5 \pm 18,6$ ), МФАТ – от 37 до 60 баллов ( $M \pm \sigma = 48,6 \pm 5,2$ ), ААТ – от 35 до 75% ( $M \pm \sigma = 56,5 \pm 12,5$ ), МФСТ – от 85 до 130 баллов ( $M \pm \sigma = 109,1 \pm 11,5$ ).

Предложенный метод витального окрашивания трипафлавином-АО тромбоцитов человека позволил отчетливо выявить в крови доноров 4 основных морфологических типа этих клеток: дискоциты, большие округлые тромбоциты, отросчатые тромбоциты, дегенеративно измененные тромбоциты (рис.16). Соотношение этих морфологических типов тромбоцитов составило 65%, 20%, 10% и 5%, что совпадает с данными других исследований [24, 123]. Биологическую полноценность тромбоцитов чаще всего оценивают, исходя из их морфологических характеристик [24-27]. Для этого часто используются автоматизированные методы морфометрии [26], однако у исследователей до

сих пор не сложилось мнения о том, что считать “морфологической нормой” тромбоцита. В многих работах к “морфологической норме” относят тромбоциты дисковидной формы (клетки “покоя”); вместе с тем показано, что действие различных повреждающих факторов (ацидоз, действие токсических веществ, резкое снижение температуры) часто приводит к потере тромбоцитами функциональной активности при сохранении их дисковидной формы [60,79,99,103]. Следовательно, среди дискоцитов могут встречаться как функционально полноценные, так и функционально неполноценные клетки. Следовательно, предложенное понятие “морфологическая норма” является неполным, т.к. не включает оценку функциональной активности тромбоцитов. Поэтому в настоящей работе используется термин “морфофункциональный статус тромбоцитов”.

Проведенное исследование подтвердило, что наличие гранул является важной характеристикой биологической полноценности тромбоцита. Показано, что клетки с гранулами (содержащие 3 и более гранул диаметром не менее 300-350 нм) являются функционально полноценными, проявляют способность к адгезии и агрегации. Клетки без гранул или содержащие 1-2 гранулы являются функционально неполноценными и не способны к адгезии и агрегации. Необходимо отметить, что среди тромбоцитов без гранул встречаются не только разрушенные (дегенеративные) или активированные (отросчатые) клетки, так и дискоциты (клетки “морфологической нормы”). При этом в популяции тромбоцитов с гранулами выявлены 4 субпопуляции клеток, различающихся по линейным размерам (диаметр), однако обладающие одинаковой способностью к адгезии на стекле и агрегации. Кроме того, в процессе хранения КТ некоторые среди тромбоцитов с гранулами выявляются клетки небольшого размера с ярко выраженной веретеновидной формой. Такие тромбоциты не относят к “морфологической норме” [26], хотя с другой стороны, нет данных о том, что веретеновидные тромбоциты обладают пониженной жизнеспособностью [86]. По всей видимости, веретеновидные тромбоциты представляют собой не поврежденные, а всего лишь

видоизмененные клетки. Можно заключить, что анализ формы и линейных размеров тромбоцитов не позволяет достоверно оценить их биологическую полноценность.

В настоящее время в клеточной биологии и биотехнологии распространено использование различных апротонных детергентов, в т.ч. ДМСО, что ставит необходимость оценки токсического воздействия этого реагента на биологическую полноценность исследуемых клеток [9,96]. В настоящей работе показано, что под действием 5% ДМСО содержание тромбоцитов с гранулами в пробе начинает снижаться уже в 1-е 10-20 мин экспозиции, а через 2-3 часа тромбоциты с гранулами полностью отсутствуют в пробе. По всей видимости, ДМСО вызывает повреждение липидных компонентов как плазматической мембраны, так и мембран, входящих в состав секреторных везикул (гранул). В результате происходит нарушение структуры гранул и потерю ими содержимого, что в конечном итоге приводит к потере тромбоцитами функциональной активности. Это наблюдение подтверждается рядом исследований [106-109], в которых показано снижение агрегационной активности богатой тромбоцитами плазмы после экспозиции с ДМСО. С другой стороны, среди популяции тромбоцитов с гранулами выявлены клетки, обладающие повышенной резистентностью к действию ДМСО (тромбоциты богатые гранулами, ТБГ). Популяции тромбоцитов с высоким содержанием ТБГ дольше сохраняют свою биологическую полноценность в присутствии ДМСО.

Анализ тромбоцитов доноров позволил установить референтные значения их морфофункциональных параметров, соответствующие норме. При этом выявлены 3 субпопуляции доноров – основная (82%), с пониженной (16%) и с повышенной (2%) активностью тромбоцитов. Это позволяет проводить отбор доноров тромбоцитов для получения КТ высокого качества. Анализ тромбоцитов КТ с помощью флуоресцентных методов весьма распространен – существуют различные флуоресцентные маркеры для

выявления различных рецепторов и маркеров активации тромбоцитов, “юных” форм тромбоцитов, мертвых клеток [83-89,96] в КТ. Однако такой анализ проводится с помощью методов проточной флуориметрии, что, во-первых, не всегда позволяет связать полученные данные с биологической полноценностью исследуемых клеток, а, во-вторых, не позволяют оценить содержание в популяции тромбоцитов клеток с высокой и низкой функциональной активностью. Методы агрегометрии и тромбоэластографии также являются малоэффективными для оценки функциональной активности КТ, т.к. позволяют проводить анализ лишь при стандартной концентрации клеток в пробе, а также не применимы для анализа активности тромбоцитов в бесплазменной среде. Поэтому разработанный метод исследования витально окрашенных клеток представляется особенно удобным для анализа биологической полноценности тромбоцитов КТ в производственной трансфузиологии, т.к. позволяет непосредственно оценить содержание функционально пригодных тромбоцитов в КТ на разных сроках хранения, независимо от концентрации клеток.

Проведенный анализ показал, что в исходных пулированных КТ тромбоциты имеют в среднем нормальные значения морфофункциональных параметров, т.е. пулированные КТ являются пригодным источником тромбоцитов человека для клинического использования. Однако содержание как аферезных, так и пулированных КТ при комнатной температуре позволяет сохранить большую часть функционально пригодных клеток лишь в течение 2-х суток. Установлено, что более длительное хранение КТ вызывало резкое падение морфофункциональных параметров тромбоцитов. Таким образом, подтверждены данные исследований, в которых рекомендуется хранить КТ при комнатной температуре не более 3-х суток вместо регламентированных 5-7 суток [42-44,69]. Следует особо отметить, что помимо сроков хранения, большое значение имеет концентрация тромбоцитов в КТ – так, при Стр. $>2,5 \cdot 10^{12}/л$  скорость снижения морфофункциональных параметров тромбоцитов КТ была гораздо выше, чем при более низких концентрациях.

При Стр. $>5*10^{12}/л$  КТ не содержали функционально пригодных клеток уже через 1 сутки хранения при комнатной температуре. Следовательно, хранение КТ с концентрацией тромбоцитов Стр. $>2,5*10^{12}/л$  при комнатной температуре представляется неэффективным. Установлено, что при криоконсервировании КТ в присутствии 5% ДМСО при  $-84^{\circ}C$ , криохранении и последующей разморозке наибольшая сохранность клеток с гранулами наблюдается в образцах КТ с высоким содержанием ТБГ (более 30%). Следовательно, оценка содержания ТБГ в концентратах тромбоцитов (КТ) может быть эффективным критерием отбора КТ, пригодных для длительного криохранения.

При многих заболеваниях наблюдается нарушение клеточного звена гемостаза, связанное со снижением числа циркулирующих тромбоцитов или потерей их биологической полноценности. В связи с этим проведена апробация разработанного метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов у 370 пациентов с различными патологическими состояниями. Было выявлено 3 группы пациентов: с нормальным, сниженным и повышенным морфофункциональным статусом тромбоцитов.

В 1-ю группу вошли пациенты, у которых не наблюдалось значимых изменений морфофункционального статуса тромбоцитов –пациенты с травмой опорно-двигательного аппарата, с хроническими трофическими язвами венозной и смешанной этиологии, пациенты после трансплантации почки и больные с пороками клапанов сердца (до операции). Морфофункциональные параметры тромбоцитов в этих группа больных составляли: Стр.гр (100,6-112,5 тыс/мкл), Дтр.гр. (50,8-56,3%), МФАТ (45,3-47,3 баллов), ААТ (50,8-57,3 балла) и значимо не отличались от таковых у доноров крови. Морфофункциональный статус тромбоцитов таких пациентов оценивался нами как нормальный. Необходимо подчеркнуть, что патологии этих пациентов не были напрямую связаны с повреждением или потерей тромбоцитов.

Во 2-ю группу вошли пациенты с достоверным снижением морфофункционального статуса тромбоцитов (пациенты, с острыми эндогенными отравлениями, абдоминальной травмой на высоте кровопотери, кардиохирургические больные с ИБС после процедуры ИК, гематологические больные). Очень низкие значения МФСТ отмечены у больных с клинически выраженным геморрагическим синдромом (гематологические больные, больные с ИБС после хирургического вмешательства), причем наиболее резко были снижены параметры, отражающие содержание функционально пригодных тромбоцитов (Дтр.гр., Стр.гр., ААТ) в циркулирующей крови. Примечательно, что у гематологических больных без ГС на фоне выраженной тромбоцитопении значения большинства морфофункциональных параметров (Дтр.гр., МФАТ, ААТ и МФСТ) снижались заметно слабее, чем у больных с ГС. Необходимо особо отметить, что кровотечения, сочетавшиеся с очень низким содержанием тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр.=1-3%) выявлены также у пациентов с концентрацией тромбоцитов в крови 90-100 тыс/мкл, т.е. при отсутствии выраженной тромбоцитопении. У пациентов с абдоминальной травмой, осложненной массивной кровопотерей, требовалась коррекция клеточного звена гемостаза. Для этого интраоперационно с учетом объема учтенной кровопотери осуществляли внутривенное введение 0,5-1,5 дозы КТ с функционально полноценными тромбоцитами (Дтр.гр=60%). После проведения клеточной трансфузионной терапии (переливание КТ) морфофункциональные параметры тромбоцитов (Дтр.гр., Стр.гр., МФАТ и ААТ) достоверно повышались.

Таким образом, с помощью предложенного морфофункционального анализа тромбоцитов представляется возможным выявить критические значения морфофункциональных параметров, при которых можно с высокой вероятностью прогнозировать развитие геморрагического синдрома у пациентов. Эти данные могут быть использованы для прогнозирования кровотечений у пациентов с тромбоцитопенией и тромбоцитопатией, а также для коррекции и объективизации проводимой трансфузионной терапии.

3-ю группу составили больные с тромбозами вен печени с повышенным морфофункциональным статусом тромбоцитов. У таких пациентов значения Стр.гр. превышало норму в 4-6 раз, МФСТ – в 1,5 раза. Стоит особо подчеркнуть, что в популяции тромбоцитов с гранулами резко повышено содержание ТБГ, которое в некоторых случаях могло достигать 90—95%. Этот эффект может быть связан с накоплением гиперактивных клеток в ходе тромбоемболических осложнений. Следовательно, резкое повышение параметров МФСТ может указывать на повышенный риск развития тромбоемболических осложнений.

Предложенный метод оценки МФСТ также пригоден для оценки чувствительности больных к антиагрегантам, как прямого, так и непрямого действия. До настоящего времени оценку чувствительности больных с данным препаратом проводили главным образом с помощью методов, оптической агрегометрии, которые, как уже неоднократно было сказано, не позволяют адекватно оценить биологическую полноценность тромбоцитов [67,68,111]. Проведенные исследования показали, что метод оценки МФСТ позволяет оценить структурную целостность и функциональную активность тромбоцитов в присутствии антиагрегантов как в циркулирующей крови, так и *in vitro*.

Итак, можно заключить, что разработанный метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов с помощью витального окрашивания позволяет проводить параллельный анализ структурной целостности и функциональной активности этих клеток. Этот метод позволяет оценить биологическую полноценность тромбоцитов независимо от их концентрации в пробе. Установлены морфофункциональные параметры тромбоцитов и референтные значения нормы. Предложенный метод может быть использован как в клинико-диагностической, так и в производственной практике.

1. Разработан витальный краситель на основе трипафлавина и акридинового оранжевого (АО), позволяющий получать дифференциальное свечение цитоплазмы и гранул клеток во флуоресцентном микроскопе. Окрашенные этим красителем тромбоциты человека сохраняют свою адгезивную и агрегационную активность.
2. Анализ свечения окрашенных трипафлавином-АО клеток позволяет оценить их морфологию, целостность внутреннего состава, насыщение гранулами и мембранными структурами т.е. морфофункциональную активность тромбоцитов. Функционально полноценными являются тромбоциты, содержащие более 3 гранул с интенсивностью свечения 40-80 фут-кандел (баллов). Отсутствие свечения гранул в тромбоцитах связано с их активацией или повреждением. Клетки интенсивностью свечения 60-80 фут-кандел – тромбоциты богатые гранулами (ТБГ) – обладают повышенной морфофункциональной, адгезивной и агрегационной активностью.
3. Разработан способ анализа адгезивной активности тромбоцитов на стекле, который основан на регистрации морфологических изменений витально окрашенных тромбоцитов с помощью флуоресцентного микроскопа. Адгезивную активность оценивают по доле клеток, способных к распластыванию на стекле с последующим выбросом гранул и образованием отростков.
4. Разработан оригинальный способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов (МФСТ), включающий оценку морфофункциональной активности тромбоцитов, выражающую структурную полноценность клеток, и морфологический анализ адгезивной активности тромбоцитов на стекле, отражающий функциональную полноценность клеток. В норме МФСТ составляет 85-130 баллов.

5. Выявлена прямая корреляционная связь ( $r=0.741-0.925$ ,  $p<0,01$ ) между агрегационной активностью и морфофункциональными параметрами тромбоцитов, подтверждающая объективность использования морфофункционального статуса тромбоцитов для интегральной оценки их биологической полноценности.
6. По морфофункциональному статусу тромбоцитов крови доноры распределялись на три популяции: с референтным (82%), повышенным (2%) и пониженным уровнем (16%) биологической полноценности клеток. При этом относительное содержание функционально полноценных клеток в концентратах тромбоцитов, полученных от доноров 1-й и 2-й популяции составляла 55-60%, тогда как от доноров 3-й популяции с пониженным уровнем МФСТ – не превышала 43%.
7. Под действием антиагрегантов происходит снижение адгезивной активности тромбоцитов при сохранении их морфофункциональной активности. Степень чувствительности тромбоцитов крови к антиагрегантам широко варьируют у разных пациентов.
8. Способ оценки МФСТ позволяет количественно и качественно охарактеризовать тромбоциты независимо от их концентрации в пробе при различных патологиях. Показано нарушение структурной целостности и функциональной активности тромбоцитов (при гематологических заболеваниях, острых экзогенных отравлениях, процедурах искусственного кровообращения); степень снижения количества циркулирующих функционально пригодных клеток (при массивных кровотечениях); гиперактивация клеток (при тромбозах).

## Практические рекомендации

Разработанный метод оценки морфофункционального статуса тромбоцитов позволяет проводить анализ биологической полноценности этих клеток в крови, богатой тромбоцитами плазме и концентрате тромбоцитов. Для проведения анализа необходимо окрасить пробу с тромбоцитами витальным красителем на основе трипафлавина-АО и затем исследовать витально окрашенные клетки на предметном стекле с помощью флуоресцентного микроскопа. Анализ морфофункциональной и адгезивной активности тромбоцитов рекомендуется проводить на одном и том же препарате. При анализе проб с концентрацией клеток выше 500 тыс/мкл рекомендуется анализировать не менее 10 полей зрения, с концентрацией от 500 до 100 тыс/мкл – не менее 20 полей зрения, с концентрацией меньше 100 тыс/мкл – не менее 40 полей зрения.

Анализ морфофункционального статуса тромбоцитов рекомендуется проводить у пациентов с нарушениями гемостаза, с тромбоцитопенией и тромбоцитозом, в ходе оценки биологической полноценности тромбоцитов КТ на разных сроках хранения, при использовании тромбоцитов в области биотехнологий.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых журналах и изданиях

1. Хватов В.Б., Журавель С.В., Гуляев В.А., Кобзева Е.Н., Макаров М.С. Биологическая полноценность и функциональная эффективность клеточных компонентов крови доноров органов // Трансплантология. – 2011. –№4. –С. 13-19.
2. Макаров М.С., Боровкова Н.В., Высочин И.В., Кобзева Е.Н., Хватов В.Б. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике // Медицинский Алфавит. Современная лаборатория. –2012. –№3. –С.32-34.
3. Ермолов А.С., Хватов В.Б., Кобзева Е.Н., Валетова В.В., Макаров М.С. Аппаратная реинфузия в неотложной хирургии // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. –2012. –№11. –С.8-14.
4. Макаров М.С., Сторожева М.В., Конюшко О.И., Боровкова Н.В., Хватов В.Б. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную активность фибробластов человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2013. –№2. –С. 111-115.
5. Макаров М.С., Боровкова Н.В., Хватов В.Б., Ларин А.Г., Коков Л.С. Способ оценки чувствительности тромбоцитов к тикагрелору in vitro // Медицинский Алфавит. Современная лаборатория. –2013. –№2. –С.34-37.
6. Макаров М.С. Флуоресценция в исследовании клеток: пути и возможности // Молекулярная медицина. –2013. –№4. – С.10-14.
7. Хватов В.Б., Макаров М.С., Боровкова Н.В. Морфологическая оценка адгезивной активности тромбоцитов с помощью витального окрашивания // Клиническая лабораторная диагностика. –2013. –№7. –С.58- 61.
8. Макаров М.С., Кобзева Е.Н., Высочин И.В., Боровкова Н.В., Хватов В.Б. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. –2013. –№9. –С. 388-391.
9. Хватов В.Б., Макаров М.С., Костин А.И., Кобзева Е.Н., Боровкова Н.В. Прогнозирование геморрагического синдрома у гематологических больных на основе морфофункционального флуоресцентного анализа тромбоцитов // Молекулярная медицина. –2013. –№5. –С.28-31.

## Патенты

Патент № 2485502 С1 МПК G01N 33/48 «Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека», авторы Хубутя М.Ш., Макаров М.С., Хватов В.Б., Высочин И.В., Кобзева Е.Н., Боровкова Н.В., Конюшко О.И., 20.06.2013.

## Методические рекомендации

Оболенский В.Н., Ермолова Д.А, Макаров М.С., Конюшко О.И., Сторожева М.В., Лаберко Л.А., Боровкова Н.В. Применение аппликаций богатой тромбоцитами аутоплазмы в лечении больных с хроническими ранами различной этиологии. – М., Департамент здравоохранения города Москвы, 2013. –16с.

## Тезисы и доклады конференций

1. Костин А.И., Макаров М.С., Хватов В.Б., Кобзева Е.Н. Роль оценки морфофункционального статуса тромбоцитов у больных с тромбоцитопенией в прогнозировании геморрагического синдрома // Материалы Конгресса гематологов России – Москва, 2012. –С.54.
2. Волков К.С., Макаров М.С., Боровкова Н.В. Определение содержания функционально активных витально окрашенных тромбоцитов в автоматическом режиме // Материалы V юбилейной конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2012. –С. 20-21.
3. Конюшко О.И., Макаров М.С., Сторожева М.В., Ермолова Д.А., Хватов В.Б. Морфометрическая оценка пролиферативной активности клеточного компонента в составе биотрансплантатов на основе коллагена 1 типа человека // Материалы V юбилейной конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2012. –С. 59-60.
4. Макаров М.С., Хватов В.Б., Боровкова Н.В. Способ оценки морфофункционального статуса витально окрашенных тромбоцитов // Материалы V юбилейной конференции «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2012. –С. 80-81.
5. Костин А.И., Макаров М.С., Хватов В.Б., Кобзева Е.Н. Эффективность нового способа прижизненной окраски гранул тромбоцитов для

прогнозирования тромбоцитопенического геморрагического синдрома // Материалы VI научно-практической конференции «Современная гематология. Проблемы и решения» – Москва, 2012. –С. 17-18.

6. Макаров М.С., Ларин А.Г., Боровкова Н.В., Коков Л.С., Хватов В.Б. Оценка клеточного звена гемостаза у кардиохирургических больных с помощью морфофункционального анализа тромбоцитов // Материалы VI всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». – Москва, 2013. –С.225-226.
7. Биткова Е.Е., Макаров М.С., Мазанов М.Х., Бранд Я.Б., Боровкова Н.В. Морфофункциональный статус тромбоцитов при операциях коронарного шунтирования у пациентов с острым Q-необразующим инфарктом миокарда // Материалы 2-го Съезда врачей неотложной медицины. – Москва, 2013. –С. 15.

## 8.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.Ф. и соавт. Биофизика. – М.: ВЛАДОС, 2000. –288с.
2. Байдун Л.В., Логинов А.В. Значение автоматического анализа крови в клинической практике // Гематология и трансфузиология. –1996. –Т.41, №2. – С. 36-41.
3. Быков В.Л. Частная гистология человека. – СПб: Сотис, 1999. –301с.
4. Василенко И.А., Кардашова Д.З., Тычинский В.П., и соавт. Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии // Вестник последипломого медицинского образования. –2009. –№3-4. –С. 64-68.
5. Васильев С.А., Мазуров А.В. Классификация и основы диагностики и терапии наследственных тромбоцитопатий. // Пробл. гематол. –1997. –№3. –С. 29-38.
6. Васильев С.А., Виноградов В.Л., Карабудагова З.К. Структура и функции тромбоцитов // Гематология и трансфузиология. –2010. –Т.55, №5. –С. 4-9.
7. Вашкинель В.К., Петров М.Н. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. –Л.: Наука, 1982. –88с.
8. Галкин В.В., Голубева В.Л., Атауллаханов Ф.И. и соавт. Проблемы контроля качества компонентов крови // Гематология и трансфузиология. –1991. –Т.36, №1. –С.37-40.
9. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции // пер. с англ. – М.: Мир, 1997. –620с.
10. Городецкий В.М. Современные принципы трансфузионной терапии травматической массивной кровопотери // Гематология и трансфузиология. – 2012. –Т. 57, № 3. – С. 3-5.

11. Городецкий В.М., Алексанян М.Ж., Ватагина Е.А. и соавт. Получение и применение концентратов тромбоцитов в гематологической практике // Материалы Конгресса гематологов России. – М., 2012. С. 7-8.
12. Дементьева И.И., Чарная М.А, Морозов Ю.А. и соавт. Тромбоцитарное звено гемостаза при кардиохирургических операциях. – М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2005. –34с.
13. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. – М.-Тверь: Триада, 2005. –227с.
14. Донников М.Ю. Орлов С.А. Зиновьева А.В. Качественная оценка морфофункциональной активности тромбоцитов по данным атомно-силовой микроскопии. // Клиническая лабораторная диагностика. –2009. –№ 8. –С.30-32.
15. Ермолов А.С., Хватов В.Б., Кобзева Е.Н. Трансфузиология и бескровная хирургия // Вестник, службы крови России. –2002. –№ 2.–С. 7-11.
16. Жибурт Е.Б., Рейзман П.В., Голосова С.А. Аферез – технология для донора и реципиента // Трансфузиология. –2005. –Т.5, №1. –С. 73-83.
17. Жибурт Е.Б., Коденев А.Т., Ващенко Г.А., Капустов В.И. Совершенствование получения концентрата тромбоцитов // Вестник службы крови России. – 2010. –№2. –С. 22-25.
18. Закржевский Е.Б., Васильева Л.Г. Люминесцентная микроскопия в клинико-гематологических исследованиях. – М.: Медгиз, 1963. –88с.
19. Замулаева И.А., Саенко А.С., Павлов В.В., Виноградова Ю.Е., Корякин С.Н. Разработка метода исследования молодых тромбоцитов с помощью проточной цитометрии // Проблемы гематологии и переливания крови. –2000. –№ 3. –С.10-15.
20. Зеленин А.В. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой. – М: Наука, 1971. –235с.

21. Зеленин Л. В., Куш А. А., Прудовский И. А. Реконструированная клетка. – М.: Наука, 1982. –320с.
22. Калинин Н.Н. Клиническое применение экстракорпоральных методов лечения. – М.: Трекпор Технолоджи, 2006. –168 с.
23. Козлов В. К. Лизосомоподобные альфа-гранулы тромбоцитов: выявление при обработке акридиновым оранжевым, некоторые свойства и преобразование в ходе реакции гемокоагуляции. // Цитология. – 1975. –Т. 17, №7. –С. 762-766.
24. Колосова Е.И., Василенко И.А., Ковалева Л.Г. Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом компьютерной морфометрии // Бюллетень СО РАМН. –2011. –Т.31, №2. –С. 58-63.
25. Коробова Ф.В., Соколинский Б.З., Козинец Г.И. Компьютерная морфометрия тромбоцитов. // Клин. лаб. диагн. –1999. –№ 10. –С. 22.
26. Коробова Ф.В., Левина Т.Н., Соколинский Б.З. и соавт.. Сравнительное исследование тромбоцитов здоровых лиц с использованием световой микроскопии и проточного счетчика Cobas Micros 18 OT. // Клин. лаб. диагн. –2000. –№12. –С. 21-24.
27. Лебедева Е.А., Ефимова С.Ю. Клиническая эффективность концентрата тромбоцитов у гематологических больных // Проблемы гематологии и переливания крови.– 2000.– №2.– С. 27–28.
28. Левит А.Л., Константинова Т.С., Костин А.И. Прогнозирование геморрагического синдрома и оптимизации показаний для профилактических трансфузий концентратов тромбоцитов у больных с амегакариоцитарной тромбоцитопенией // Проблемы гематологии и переливания крови. –2005. –№ 4. –С.7-16.
29. Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. Практическая и лабораторная гематология. / пер. с англ. под ред. А.Г.Румянцева. –М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. –672с.

30. Луппа Х. Основы гистохимии. – М.: Мир, 1980. –120с.
31. Мазуров А.В. Физиология и патология тромбоцитов. – М.: Литерра, 2011. – 248с.
32. Мининкова А.И. Структура и функции тромбоцитов. Исследование тромбоцитов методом проточной цитофлюориметрии (обзор литературы). // Клиническая лабораторная диагностика. –2010. –№ 11. –С.21-26; –2011. –№ 4. –С.25-30.
33. Оболенский В.Н., Ермолова Д.А. Применение тромбоцитарных факторов роста и коллагеновых биопрепаратов в лечении больных с хроническими трофическими язвами различной этиологии. // Хирургия. –2012. –Т.42, № 5. –С. 42-47.
34. Пантелеев М.А., Баландина А.Н., Сошитова Н.П. и соавт. Пространственная динамика гемостаза и тромбоза: теория и практика// Тромбоз, гемостаз и реология. –2010. –Т.44, №4. –С. 48-60.
35. Погорелов В.М., Г.И. Козинец. Клеточные основы трансфузиологии. В кн.: Трансфузиология: национальное руководство (под ред. А.А.Рагимова ). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. –с.114-148.
36. Погорелов В. М., Медовый В. С., Хазем Г. М., Козинец Г. И. Анализ клеточного изображения. // Клинич. лаб.диагн. –1995. –№3. –С. 40-43.
37. Практическая трансфузиология / под ред. Г.И. Козинца – Москва: Практическая медицина, 2005. –544с.
38. Рагимов А.А. (ред.) Трансфузиология. Национальное руководство. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. –1184 с.
39. Рагимов А.А., Соловьева И.Н. Общая характеристика трансфузиологических методов гемокоррекции и методов экстракорпоральной гемокоррекции. В кн.: Трансфузиологическая гемокоррекция: учебное пособие для врачей ( под ред. А.А.Рагимова). –М.: Практическая медицина, 2008. –С.29-61.
40. Ромейс Б. Микроскопическая техника. – М.: Издательство иностранной литературы, 1954. –С. 171-172.

41. Роскин Г.И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. – М.: Советская наука, 1957. 470с.
42. Руководство по гематологии: В 3 т./Под ред. А.И. Воробьева.–Т.1. –М.: Ньюдиамед, 2002. –280с.
43. Руководство по приготовлению, использованию и обеспечению качества компонентов крови/ Европейский комитет по переливанию крови – 1бизд. – Нанси (Франция): Biales, 2010. – 490с.
44. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. Гемотрансфузионная терапия в педиатрии и неонатологии: Руководство для врачей. – М.: МАКС Пресс, 2002. –644 с.
45. Сулимов В.А., Мороз Е.В. Резистентность к антитромбоцитарным препаратам (аспирину, клопидогрелю) у пациентов, подвергающихся элективному стентированию коронарных артерий // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. –2012. –Т.8, №1. –С.23-30.
46. Технический регламент о требованиях к безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии (приложение № 1 к постановлению правительства РФ № 29 от 26.01.2010 года).
47. Трунилина Н. Н., Мурина М. А., Рощупкин Д. И., Бержицкая В. В., Сергиенко В. И. Исследование начальной агрегации и аккумуляции акридинового оранжевого в тромбоцитах при хранении тромбоцитарного концентрата с использованием гипохлорита натрия //Гематология и трансфузиология. –2000. –№ 5. –С.17-19.
48. Фаддеева М.Д., Беляева Т.Н. ДНК-интеркаляторы: взаимодействие с ДНК и другими клеточными компонентами и применение в биологических исследованиях. // Цитология. –1991. –Т.33, №10. – С.3-10.

49. Фрайштат Д.М. Реактивы и препараты для микроскопии. – М.: Химия, 1980. –480с.
50. Хватов В.Б. Клиническая трансфузиология при неотложных состояниях (современные концепции и перспективы). – М.: НИИ СП им. Н.В.Склифосовского, 2003. –27с.
51. Хватов В.Б. К оценке биологической полноценности и функциональной активности клеточных компонентов крови, используемых в клинической практике. // Эфферентная и физико-химическая медицина. –2011. –№3. –С. 21-25.
52. Хватов В.Б., Журавель С.В., Гуляев В.А. и соавт. Биологическая полноценность и функциональная эффективность клеточных компонентов крови доноров органов // Трансплантология. –2011. –№4. –С. 13-19.
53. Шевченко Ю. Л., Жибурт Е. Б. Безопасное переливание крови: руководство для врачей. –СПб.: ПИТЕР, 2000. –320с
54. Шитикова А. С. Тромбоцитарный гемостаз. –СПб.: Изд-во СПб ГМУ, 2000. –С.227.
55. Ягода А.В., Корой П.В. Патология печени и функция тромбоцитов // – Ставрополь: СтГМА, 2008. –110с.
56. Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al Molecular Biology of the Cell, 4th edition // –New York: Garland Science, 2002. –735p.
57. Asmis L., Tanner F.C., Sudano I., et al DMSO inhibits human platelet activation through cyclooxygenase-1 inhibition. A novel agent for drug eluting stents? // –Biochem Biophys Res Commun. –2010. –Vol.39. –P.1629-1633.
58. Berger W. Trypaflavin-thionine method for color separation of pathologic glia and normal brain tissue.// Zentralbl Allg Pathol. –1971. –Vol. 114,№4. – P. 513-514.

59. Berns M. W. Fluorescence analysis of cells using a laser light source. // *Cells Biophysics*. –1979. –Vol. 1. –P. 1—13.
60. Cannon C.P., Harrington R.A., James S. et al. Comparison of ticagrelor with clopidogrel in patients with a planned invasive strategy for acute coronary syndromes (PLATO): a randomised double-blind study. // *Lancet*. –2010. –Vol. 375. –№ 9711. –P. 283–293.
61. Corash L. Measurement of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry. // *Blood Cells*. –1990. – Vol. 16. – P. 97-106; discussion 107-108.
62. Corash L., Mole Y., Levin J., Baker G. Regulation of platelet heterogeneity: effect of thrombocytopenia on platelet volume and density. // *Exp Hematol*. –1990. –Vol. 18. –P. 205-212.
63. Curzen N., Sambu N. Antiplatelet therapy in percutaneous coronary intervention: is variability of response clinically relevant? // *Heart*. –2011. –Vol. 97, №17. –P. 1433-1440.
64. Delobel J., Rubin O., Prudent M. Biomarker analysis of stored blood products: emphasis on pre-analytical issues.// *Int J Mol Sci*. –2010. –№11. –P. 4601-4617.
65. Despotis G.J., Avidan M.S., Hogue C. W. Jr. Mechanisms and attenuation of haemostatic activation during extracorporeal circulation. // *Ann. Thorac. Surg*. –2001. –Vol. 72. –№ 5. –P.1821-1831.
66. Egidi M.G., D'Alessandro A., Mandarello G., Zolla L. Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics // *Blood Transfus*. –2010. –№8. –P. 73-81.
67. Goodman S.L., Tweden K.S., Albrecht R.M. Platelet interaction with pyrolytic carbon heart-valve leaflets. // *J. Biomed. Mater. Res*. –1996. –Vol.32, №2. – P. 249-258.

68. Gori A.M., Marcucci R., Migliorini A. et al. Incidence and clinical impact of dual non-responsiveness to aspirin and clopidogrel in patients with drug-eluting stents. // *J Am Coll Cardiol.* –2008. –Vol.52, №9. –P. 734-739.
69. Guide to preparation, use and quality assurance of blood components, recommendation № R(95)15/ –12th edition, Council of Europe, 2006. –268p.
70. Gurbel P.A., Bliden K.P., Hayes K.M., Tantry U.S. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. // *J Am Coll Cardiol.* –2005. –Vol.45. –P. 1392-1396.
71. Görlinger K, Jambor C, Dirkmann D. Platelet function analysis with point-of-care methods. // *Herz.* –2008. –Vol. 33, №4. –P. 297-305.
72. Grinstein S, Furuya W. Intracellular distribution of acridine derivatives in platelets and their suitability for cytoplasmic pH measurements. *Biochim Biophys Acta.* –1984. –Vol.803, № 4. –P.221-228.
73. Gupta G., Massague J. Platelets and metastasis revisited: a novel fatty link // *J Clin Invest.* –2004. – Vol. 114, № 12. – P. 1691-1693.
74. Halicka H.D., Zhao H., Podhorecka M., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Cytometric detection of chromatin relaxation, an early reporter of DNA damage response // *Cell Cycle.* –2009. –№8. –P. 2233-2237.
75. Harrison P., Cramer E.M. Platelet granules. // *Blood. Rev.* –1993. –№7. –P. 52-62.
76. Harrison P, Mumford A. Screening tests of platelet function: update on their appropriate uses for diagnostic testing. // *Semin Thromb Hemost.* – 2009. –Vol. 35. – P. 150–157.
77. Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals.–6ed. *Molecular Probes*, 1996. –679p.
78. Hein B., Willig K.I., Hell S.W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. // *Proc Natl Acad Sci USA.* –2008. –Vol.105, №38. –P.14271-1427.

79. Hertfelder H.J., Bös M., Weber D., Winkler K., Hanfland P., Preusse C.J. Perioperative monitoring of primary and secondary hemostasis in coronary artery bypass grafting. // *Semin Thromb Hemost.* – 2005. –Vol. 31, №4. –P. 426-440.
80. Kehrel B., Brodde M. State of the art in platelet function testing.// *Transfus Med Hemother.* –2013. –Vol. 40, №2. –P.73-86.
81. Kemeny G., Feszt T., Guendisch M., Hadnagy C. The effect of various antimetabolic agents (colchicine, urethane and tryptaflavin) on tissue alkaline and acid phosphatase activity. // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* –1963. –Vol. 141. – P. 176-80.
82. Kikuchi L., Park J.Y., Victor C., Davies J.E. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces // *Biomaterials.* –2005. –Vol. 26, №26. – P. 5285–5295.
83. Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I., Panteleev M.A. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor. // *J Thromb Haemost.* –2008. –Vol.6, №9. –P.1603-1605.
84. Kozlov V.K., Markosian R.A., Buriachkovskaia L.I. Lysosomes-like thrombocyte alpha-granules: the activation and inhibition of the release of the contents in blood coagulation. // *Tsitologiya.* –1979. –Vol.21, № 6. –P.738-742.
85. Kusch A.A., Niyazmatov A.A. Zelenin A.V. The changes in the properties of chromatin from activated and non-activated lymphocytes at different stages of maturation under the action of salt solutions of different concentration // *Cell Differentiation.* –1980. –№9. –P. 291-304.
86. Lam W.A., Chaudhuri O., Crow A., Webster K.D., Li T.D., Kita A., Huang J., Fletcher D.A. Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening.// *Nat Mater.* –2011. –№10. – P. 61-66.
87. Lenaz G, D'Aurelio M, Merlo PM et al. Mitochondrial bioenergetics in aging // *Biochim. Biophys. Acta.* –2000. –Vol.1459. –P. 397-404.

88. Leytin V., Freedman J. Platelet apoptosis in stored platelet concentrates and other models. // *Transfus.Apheresis.Sci.* –2003. –Vol. 28. –P. 285-295.
89. Leytin V., Allen D.J., Gwozdz A., Garvey B., Freedman J. Role of platelet surface glycoprotein Ib alpha and P-selectin in the clearance of transfused platelet concentrates. // *Transfusion.* –2004. –Vol. 44. –P. 1487-1495.
90. Maltsev V. P. Scanning Flow Cytometry for Individual Particle Analysis // *Review of Scientific Instruments.* –2000. –Vol. 71. –P. 243–255.
91. Martin J., Plumb J., Killy R., Kishk Y. Changes in volume and density of platelets in myocardial infarction. // *Br Med J.* –1983. –Vol. 287. –P. 456459.
92. Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts// *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radial Endod.* –1998. –Vol.85, №6. –P. 638-646.
93. Mercola M., Wang C.Y., Kelly J., Brownlee C., Jackson-Grusby L., Stiles C. Selective expression of PDGF A and its receptor during early mouse embryogenesis // *Dev Biol.* –1990. –Vol.138, №1. –P. 114-122.
94. Nakanishi J., Takarada T., Yamaguchi K., Maeda M. Recent advances in cell micropatterning techniques for bioanalytical and biomedical sciences. // *Anal. Sci.* –2008. –Vol. 24. –P. 67–72.
95. Navarese E.P., Buffon A., Kozinski M. et al. A critical overview on ticagrelor in acute coronary syndromes. // *QJM.* –2013. –Vol. 106, №2. –P.105-115.
96. Oliver A.E., Tablin F., Walker N.J., Crowe J.H. The internal calcium concentration of human platelets increases during chilling. // *Biochim Biophys Acta.* –1999. – Vol.1416. –P. 349-360.
97. Okada M., Sagawa T., Tominaga A., Kodama T., Hitsumoto Y. Two mechanisms for platelet-mediated killing of tumour cells: one cyclo-oxygenase dependent and the other nitric oxide dependent // *Immunology.* –1996. –Vol. 89, № 1. – P. 158-164.
98. Pagano R.E. Lipid traffic in eukaryotic cells: mechanisms for intracellular transport and organelle-specific enrichment of lipids. // *Curr Opin Cell Biol.* –1990. –Vol.2, №4. –P. 652–663.

99. Penington D.G., Lee N.L.Y., Roxburgh A.E., McGready J.R. Platelet density and size: the interpretation of heterogeneity. // *Br J Haematol.* –1976. –Vol. 34. –P. 365-376.
100. Polasek J. Lysosomal concept of platelet secretion-revisited. // *Eur J Haematol Suppl.* –1989. –Vol.50. –P.3-24.
101. Pollard M.D., Earnshaw W.C. *Cell Biology.* –NY: Elsevier Science, 2007. –928c.
102. Popov E.G., Mejlumian A.G., Gavrilov I.Yu., Gabbasov Z.A., Pozin E.Ya. Evaluation of the ability of intact platelets to accumulate acridine orange. // *Experientia.* –1988. –Vol. 44, №7. –P. 616-618.
103. Rebullia P. In vitro and in vivo properties of various types of platelets. // *Vox Sang.* –1998. –Vol. 74(suppl 2). –P. 217-222.
104. Reilly J.T. Cytogenetic and molecular genetic aspects of idiopathic myelofibrosis// *Acta Haematol.* –2002. –Vol. 108, № 3. –P. 113–119.
105. Salzman N.H., Maxfield F.R. Quantitative fluorescence techniques for the characterization of endocytosis in intact cells. // *Subcell Biochem.* –1993. –Vol.19. –P. 95-123.
106. Schubert P., Devine D.V. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways // *Blood Transfus.* –2010. –№8. –P. 69-72.
107. Shapiro A. D. Platelet Function Disorders. Treatment of Hemophilia Monograph Series, Number 19. World Federation of Hemophilia: 1999, –297p.
108. Shapiro E.A., Grinfel'dt M.G., Kaulin A.B. Cooperative sorbtion of tryptaflavin by glycerinized muscle fibers. I. Adsorption isotherm and changes in the fluorescence polarization of the sorbed dye.// *Tsitologiya.* –1976. –Vol.18, №2. –P. 183-188.
109. Shrivastava M. The platelet storage lesion. // *Transfus Apher Sci.* –2009. – Vol.41. – P. 105-113.

110. Shroff H., Galbraith C.G., Galbraith J.A., Betzig E. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics.// *Nat Methods*. – 2008. –Vol.5. –P. 417–423.
111. Snoep J.D., Hovens M.M., Eikenboom J.C. et al. Clopidogrel nonresponsiveness in patient undergoing percutaneous intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. // *Am Heart J*. 2007. –Vol. 154, №2. –P.221-231.
112. Slichter S.J. Platelet transfusion: future directions // *Vox Sang*.– 2004. – Vol. 8, Suppl. 2.– P. 47–51.
113. Suggs L.J., West J.L., Mikos A.G. Platelet adhesion on a bioresorbable poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) copolymer. *Biomaterials*. –1999. –Vol. 20, №7. –P. 683–690.
114. Tablin F., Wolkers W.F., Walker N.J. Membrane reorganization during chilling: implications for long-term stabilization of platelets.// *Cryobiology*. –2001. – Vol.43. –P. 114-123.
115. Tamada Y., Kulik E.A., Ikada Y. Simple method for platelet counting. // *Biomaterials*. –1995. –Vol.16, №3. –P. 259–261.
116. Terasaki M, Loew L, Lippincott-Schwartz J, Zaal K. Fluorescent staining of subcellularorganelles: ER, Golgi complex, and mitochondria.// *Curr Protoc Cell Biol*. –2001;Chapter 4:Unit 4.4.
117. Truant A.L., Conaron J., Moghaddas J. Effect of pre-stain viability on the acid-fast staining characteristics of *Mycobacterium* species.// *Diagn Microbiol Infect Dis*. –2001. –Vol.39. –P. 121-123.
118. Tschoepe D., Esser J., Schwippert B., Rosen P., Kehrel B., Niewuenhuis H., Gries F. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. // *Semin Thromb Hemost*. –1991. –Vol. 17. –P. 433-439.
119. Tsien R.Y. The green fluorescent protein. // *Annu Rev Biochem*. –1998. –Vol. 67. –P.509–544.

120. Valeri C.R., Macgregor H., Ragno G. Correlation between in vitro aggregation and thromboxane A2 production in fresh, liquid-preserved, and cryopreserved human platelets: effect of agonists, pH, and plasma and saline resuspension. // *Transfusion*. – 2005. –Vol. 45. –P. 596-603.
121. Velik-Salchner C., Maier S., Innerhofer P., Kolbitsch C., Streif W., Mittermayr M., Praxmarer M., Fries D. An assessment of cardiopulmonary bypass-induced changes in platelet function using whole blood and classical light transmission aggregometry: the results of a pilot study. // *Anesth Analg*. –2009. – Vol.108, №6. –P. 1747-1754.
122. Verhoeven A.J., Verhaar R., Gouwerok E.G., de Korte D. The mitochondrial membrane potential in human platelets: a sensitive parameter for platelet quality. // *Transfusion*. –2005. – Vol.45. –P. 82-89.
123. Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.W . *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. –Boston: Butterworths; 1990.
124. Wang C., Mody M., Herst R., Sher G., Freedman J. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. // *Transfus.Sci*. –1999. – Vol. 20, №2. –P.129-139.
125. Wang Z., Ahmad A. Li Y., Kong D., Asfar S. Azmi, Banerjee S., Sarkar F. H. Selective expression of PDGF A and its receptor during early mouse embryogenesis // *Biochim Biophys Acta*. –2010. –Vol. 180, №6. – P. 122–130.
126. White J. Platelets are coverocytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. // *Platelets*. –2005. –Vol. 16. –P. 121-131.
127. Willig K.I., Kellner R.R., Medda R., Hein B., Jakobs S., Hell S.W. Nanoscale resolution in GFP-based microscopy.// *Nat Methods*. –2006. –Vol.3. –P. 721–723.
128. Xavier R.G., White A.E., Fox S.C. Enhanced platelet aggregation and activation under conditions of hypothermia. // *Thromb Haemost*. –2007. –Vol. 98. –P. 1266-1275.

129. Youssefian T., Masse J., Rendu F., Guichard J., Cramer E. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. // *Blood*. –1997. –Vol. 89, № 11. –P. 4047-4057.
130. Yakimenko A.O., Verholomova F.Y., Kotova Y.N., Ataulakhanov F.I, Panteleev M.A. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations. // *Biophys J*. –2012. – Vol. 102, №10. –P. 2261-2269.
131. Yardumian D.A., Mackie I.J., Machin S.J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *Journal of Clinical Pathology*. –1986. –Vol. 39. –P. 701-712.
132. Zelenin A.V. Acridine orange as a probe for cell and molecular biology. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*. –London: Acad. Press., 1999. –P. 117-135.