

ПРИМЕНЕНИЕ ВИТАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ДЛЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО АНАЛИЗА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА КОРОТКОГО ХРАНЕНИЯ

М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин, Н.В. Боровкова, В.Б. Хватов

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

Проведен анализ биологической полноценности клеток аферезных и пулированных концентратов тромбоцитов в ходе короткого хранения (5 суток) с помощью метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов, основанного на витальном окрашивании клеток с дальнейшим анализом во флуоресцентном микроскопе. Установлено, что биологическая полноценность тромбоцитов человека сохраняется в процессе получения аферезных и пулированных концентратов. Вместе с тем нормальные значения морфофункциональных параметров в концентратах тромбоцитов сохраняются лишь в течение двух суток хранения при 22 °С. Более длительное хранение приводит к значительному снижению структурной целостности и функциональной активности тромбоцитов.

Ключевые слова: концентраты тромбоцитов, витальное окрашивание, тромбоциты с гранулами, морфофункциональный статус.

USE OF VITAL STAINING IN STORED HUMAN PLATELETS MORPHOFUNCTIONAL ANALYSIS

M.S. Makarov, E.N. Kobzeva, I.V. Vysochin, N.V. Borovkova, V.B. Khvatov

N.V. Sklifosovsky Scientific Research Emergency Aim Institute, Moscow

Apheresis and pooled platelet concentrates, stored at 22°C during 5 days, were studied with morho-functional platelet rate analysis, based on vital cell staining and registration with fluorescent microscope. It was revealed that apheresis and pooled PC had, on the average, normal values of morphological and functional parameters. On the other hand, both PC kept MFPR of cells only for 2 days storage. Longer PC storage caused the significant decay of morphological and functional platelet parameters.

Key words: platelet concentrates, vital cell staining, platelet with granules, morho-functional platelet rate.

В последние десятилетия постоянно возрастают потребности в тромбоцитах человека для лечения и профилактики геморрагических осложнений, обусловленных снижением количества тромбоцитов или их дисфункцией [5, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 22]. Тромбоциты человека активно используют в области гематологии, хирургии, реаниматологии, акушерства и гинекологии, травматологии, трансплантологии, кардиохирургии [13, 14, 15]. 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 [5, 16]. Поэтому наряду с аферезными КТ экономически выгодным представляется заготовка пулированных, полученных из лейкотромбослая разных доноров. Пулированные КТ имеют меньшую стоимость и могут быть получены от большого количества доноров [4, 22]. Вместе с тем клиническое использование любых типов КТ ставит проблему оценки не только эффективности и безопасности трансфузии тромбоцитов, но и биологической полноценности и функциональной

активности этих клеток [15, 21]. Исследование биологической полноценности тромбоцитов у доноров крови и плазмы не регламентировано документами службы крови, вследствие чего в производственной трансфузиологии возникает необходимость адекватной оценки качества КТ, особенно на поздних сроках хранения [20, 21, 22, 23, 24].

В клинико-диагностической практике распространена оценка функциональной активности тромбоцитов с помощью методов агрегометрии и тромбоэластографии [10, 14, 20, 24], однако такой подход имеет ряд ограничений: необходимость работы с определенными диапазонами концентраций тромбоцитов, невозможность анализа тромбоцитов в бесплазменной среде, отсутствие оценки структурной целостности тромбоцитов и анализа соотношения клеток с высокой и низкой функциональной активностью. Биологическая активность и функциональная полноценность тромбоцитов напрямую зависят от их морфологической целостности [2, 11, 23], поэтому наиболее достоверными методами оценки качества тромбоцитов представляются морфометрические и цитоморфометрические методы.

Существуют различные морфометрические методы оценки качества тромбоцитов человека: с помощью световой, электронной и атомно-силовой микроскопии [2, 3, 7, 8, 19]. Однако во всех этих методах применяется химическая фиксация тромбоцитов, которая делает невозможной оценку их функциональной активности и не всегда позволяет достоверно оценить структурную целостность. Морфометрические и цито-морфометрические методы, в которых не требуется химическая фиксация, – фазово-контрастная и интерференционная микроскопия [1, 20], а также проточная флуориметрия [6, 17, 18, 23] – не позволяют напрямую связать регистрируемые параметры тромбоцитов с их основными функциями (агрегация, адгезия). Наиболее перспективной представляется интегральная оценка, включающая параллельный анализ целостности структуры тромбоцита и его функциональной активности. Витальное окрашивание лежит в основе разработанного нами морфофункционального анализа тромбоцитов человека с помощью флуоресцентного микроскопа [12]. Такой подход позволяет охарактеризовать всю популяцию исследуемых тромбоцитов с учетом их структурной целостности и адгезивной активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов консервированной крови (CPD 1:7) 100 доноров крови (контроль), 50 образцов КТ, полученных с помощью аппаратного афереза у доноров тромбо-

цитов (афКТ), и 50 пулированных КТ из лейкотромбослоя доноров крови (пулКТ). Объем каждого афКТ составлял 100-120 мл, пулКТ – 20-30 мл. Все образцы хранили при комнатной температуре (20-22 °С) на горизонтальном шейкере в течение 5 суток. Морфофункциональный анализ КТ проводили с интервалом в 1 сутки. Для этого образцы тромбоцитов окрашивали витальным флюорохромным красителем на основе трипафлавина и акридинового оранжевого и анализировали во флуоресцентном микроскопе. В ходе анализа определяли следующие параметры.

1. $C_{тр.}$ – концентрация тромбоцитов ($10^9/л$).
2. $D_{тр.гр.}$ – относительное содержание тромбоцитов с гранулами (%), отражает относительное содержание функционально пригодных клеток в популяции.

3. $C_{тр.гр.}$ – концентрация тромбоцитов с гранулами ($10^9/л$). Определяется по формуле:

$$C_{тр.гр.} = C_{тр.} \times D_{тр.гр.}$$

4. МФАТ – морфофункциональная активность тромбоцитов (баллы). МФАТ отображает целостность внутренней структуры тромбоцита и среднее содержание гранул в расчете на одну клетку. Оценивается по интенсивности свечения окрашенных клеток.

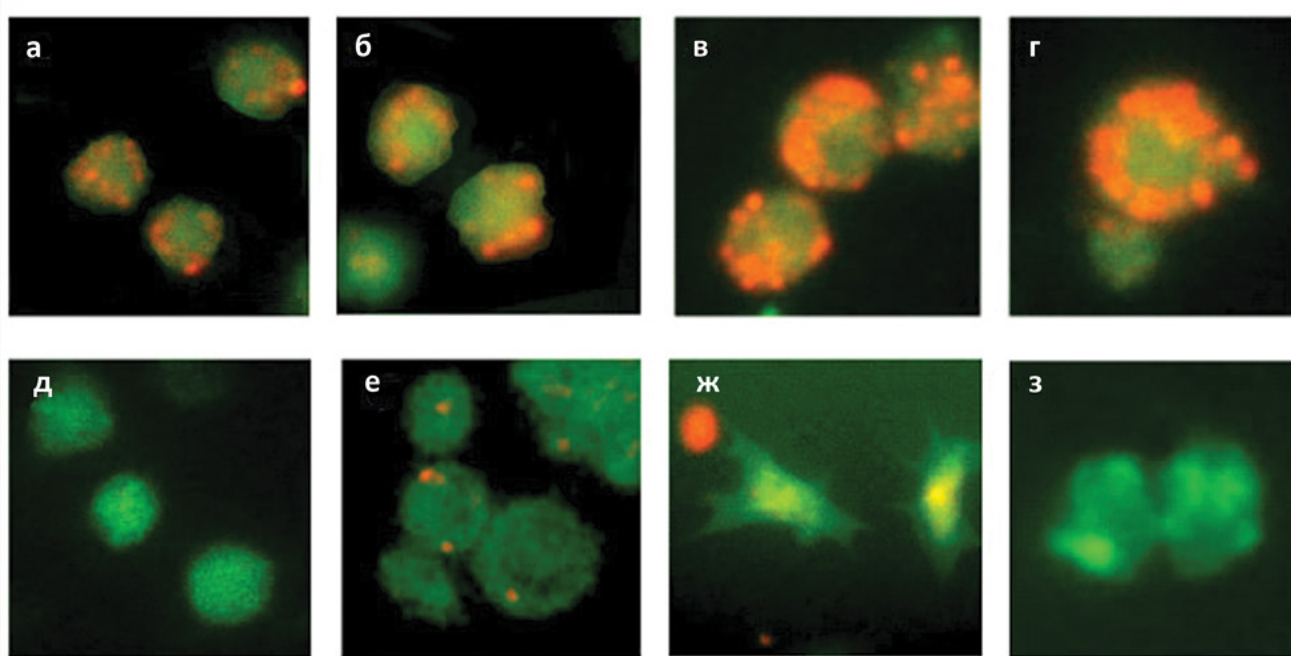
5. ААТ – адгезивная активность тромбоцитов на стекле (баллы). ААТ отображает содержание в популяции тромбоцитов клеток, обладающих адгезивной активностью на стекле.

6. МФСТ – морфофункциональный статус тромбоцитов (баллы) – интегральная оценка структурной целостности и адгезивной активности тромбоцитов. МФСТ определяется как сумма МФАТ и ААТ.

Статистический анализ проводили на персональном компьютере с помощью пакетов программ Microsoft Excel 5.0. Вычисляли средние арифметические значения (M) и среднеквадратичные отклонения (σ). Различия значений, коэффициент g и значимость влияния считали достоверными при уровне вероятности более 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенный метод витального окрашивания трипафлавином и акридиновым оранжевым тромбоцитов человека позволяет отчетливо выявить в крови доноров 4 основных морфологических типа этих клеток: дискоциты, большие округлые тромбоциты, отростчатые тромбоциты, дегенеративно измененные тромбоциты (см. рисунок). При этом биологически полноценными являются только клетки, содержащие гранулы, независимо от их линейных размеров.



Флуоресцентная микроскопия тромбоцитов человека, витально окрашенных триафлавином и акридиновым оранжевым. 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

В образцах афКТ значения $D_{тр.гр.}$, МФАТ, ААТ и МФСТ значимо не отличались от аналогичных показателей в крови доноров ($p > 0,05$), что позволяет сделать вывод о сохранении биологической полноценности тромбоцитов в процессе автоматического афереза. В образцах пулКТ значения $C_{тр.}$ и $C_{тр.гр.}$ были достоверно выше аналогичных показателей

в афКТ, а значения $D_{тр.гр.}$, ААТ и МФСТ – достоверно ниже (см. таблицу). Таким образом, биологическая полноценность тромбоцитов в афКТ была в среднем выше, чем в пулКТ. С другой стороны, МФАТ, ААТ и МФСТ в большинстве образцов пулКТ (46 из 50) соответствовали норме.

Морфофункциональные параметры тромбоцитов в крови доноров, аферезных и пулированных КТ

Морфофункциональные параметры тромбоцитов	Кровь доноров (n=100)		Аферезные КТ (n=50)		Пулированные КТ (n=50)	
	$M \pm m$	пределы	$M \pm m$	пределы	$M \pm m$	пределы
Концентрация тромбоцитов, $10^9/л$	247,2±27,8	150-390	2115,2±451,5*	1000-2500	5801,1±2112,2*, **	2000-12000
Доля тромбоцитов с гранулами, %	57,5±8,5	35-75	54,7±8,7	35-75	45,2±9,4*, **	20-65
Концентрация тромбоцитов с гранулами, $10^9/л$	116,8±21,2	60-190	1170,6±225,8*	400-2000	2612,5±821,9*, **	400-6000
МФАТ, баллы	48,6±4,5	36-60	47,5±4,1	35-60	43,7±7,4	30-58
ААТ, баллы	55,6±4,8	35-75	54,0±6,2	30-75	44,0±10,1*, **	15-65
МФСТ, баллы	102,9±4,8	75-130	100,6±5,8	67-137	82,5±8,7*, **	45-123

*достоверно относительно доноров ($p < 0,05$);

**достоверно относительно аферезных КТ ($p < 0,05$).

Образцы пулКТ вследствие их высокой вариабельности по концентрации тромбоцитов были разделены на три группы: 1-я (n=8) – с $C_{тр.}$ до $2,5 \times 10^{12}/л$; 2-я (n=25) – с $C_{тр.}$ $2,5-5 \times 10^{12}/л$; 3-я (n=17) – с $C_{тр.} > 5 \times 10^{12}/л$. Установлено, что МФСТ в 1-й группе пулКТ составлял $98,6 \pm 7,8$, во 2-й – $87,5 \pm 14,8$, в 3-й – $80,1 \pm 15,6$ балла. Между МФСТ 1-й группы пулКТ и МФСТ афКТ при равной $C_{тр.}$ достоверных различий не выявлено, тогда как во 2-й и 3-й группах пулКТ при повышенной $C_{тр.}$ зафиксировано 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 КТ в ходе хранения отмечено постепенное снижение $C_{тр.гр.}$, причем динамика уменьшения данного показателя была различной в разных группах. Так, в афКТ $C_{тр.гр.}$ практически не снижалась в течение 2 суток хранения. Через 3 суток $C_{тр.гр.}$ в афКТ снизилась в среднем на 70%, через 4 – на 95%. Через 5 суток хранения афКТ не содержали тромбоцитов с гранулами. В пулКТ уменьшение количества тромбоцитов с гранулами наступало в более ранние сроки по сравнению с афКТ. Так, в 1-й группе пулКТ $C_{тр.гр.}$ через 2 суток снизилась на 45%, через 3 – на 90%, во 2-й – соответственно на 90 и 99%. Через 4 суток хранения 1-я и 2-я группы пулКТ не содержали тромбоцитов с гранулами. Подчеркнем, что в 3-й группе отмечено полное отсутствие тромбоцитов с гранулами уже через 1 сутки хранения.

Выявлено, что с уменьшением $C_{тр.гр.}$ в КТ наблюдалось изменение МФАТ и ААТ, при этом динамика снижения ААТ была сходной с $C_{тр.гр.}$. 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, выходящее за нижний предел нормы, составляя в среднем $32,9 \pm 2,0$ и $21,6 \pm 2,1$ балла при норме $48,6 \pm 4,5$ и $55,6 \pm 4,8$ балла. Через 4-5 суток значения МФАТ в афКТ и пулКТ 1-й группы составляли менее 27 баллов, значения ААТ – менее 3 баллов, что указывало на функциональную неполноценность этих КТ. В пулКТ 2-й группы МФАТ и ААТ заметно снижались уже через 1 сутки хранения (до $37,9 \pm 4,0$ и $37,1 \pm 2,1$ балла), но не выходили за нижние пределы нормы. Через 3 суток МФАТ и ААТ составляли $26,6 \pm 1,1$ и $1,5 \pm 0,4$ балла, 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 количества тромбоцитов с гранулами, сниженный уровень МФАТ и ААТ в пулКТ при хранении при комнатной температуре и перемешивании можно связать с повышенной $C_{тр.}$ по сравнению с афКТ.

Предложенный метод морфофункционального анализа тромбоцитов с помощью витального окрашивания флюорохромами позволил оценить как структурную целостность, так и функциональную активность исследуемых клеток независимо от их концентрации в пробе. Анализ тромбоцитов с помощью флуоресценции весьма распространен: существуют различные маркеры для выявления различных рецепторов и маркеров активации тромбоцитов, «юных» форм тромбоцитов, мертвых клеток [6, 17, 22, 23]. Однако такой анализ проводится с помощью методов проточной флуориметрии, что не всегда позволяет, во-первых, связать полученные данные с биологической полноценностью исследуемых клеток, а во-вторых, оценить содержание в популяции тромбоцитов клеток с высокой и низкой функциональной активностью. Поэтому предложенный метод исследования витально окрашенных клеток представляется особенно удобным для анализа биологической полноценности КТ в производственной трансфузиологии, т.к. позволяет непосредственно оценить содержание функционально пригодных клеток в КТ разных сроков хранения.

Проведенный анализ показал, что в исходных пулированных концентратах тромбоциты имеют в среднем нормальные значения морфофункциональных параметров, т.е. пулированные КТ являются пригодным источником тромбоцитов человека для клинического использования. С другой стороны, содержание как аферезных, так и пулированных КТ при комнатной температуре позволяет сохранить большую часть функционально пригодных клеток лишь в течение 2 суток. Более длительное хранение КТ приводит к резкому падению морфофункциональных параметров тромбоцитов. Таким образом, подтверждены данные исследований, в которых рекомендуется хранить КТ при комнатной температуре не более 3 суток вместо регламентированных 5-7 [13, 16, 19]. Однако помимо сроков хранения большое значение имеет $C_{тр.}$ в КТ: так, при $C_{тр.} > 2,5 \times 10^{12}/л$ скорость снижения морфофункциональных параметров КТ была гораздо выше, чем при более низких концентрациях. При $C_{тр.} > 5 \times 10^{12}/л$ КТ не содержали функционально пригодных клеток уже через 1 сутки хранения при комнатной температуре. Таким образом, использование в клинической практике КТ с $C_{тр.} < 2,5 \times 10^{12}/л$ со сроком хранения не более 2 суток представляется наиболее обоснованным.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Василенко И.А., Пашкин И.Н., Суслов В.П., Власова Е.А.* Динамика морфометрических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбогенности диализных мембран // Урология. 2011. №2. С.36-41.
2. *Вашкинель В.К., Петров М.Н.* Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. Л.: Наука, 1982.
3. *Донников М.Ю., Орлов С.А., Зиновьева А.В.* Качественная оценка морфофункциональной активности тромбоцитов по данным атомно-силовой микроскопии // Клин. лаб. диагн. 2009. №8. С.30-32.
4. *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.
5. *Жибурт Е.Б., Рейзман П.В., Голосова С.А.* Аферез – технология для донора и реципиента // Трансфузиология. 2005. №1. С.73-83.
6. *Замулаева И.А., Саенко А.С., Павлов В.В. и др.* Разработка метода исследования молодых тромбоцитов с помощью проточной цитометрии // Пробл. гематол. перелив. крови. 2000. №3. С.10-15.
7. *Колосова Е.Н., Василенко И.А., Ковалева Л.Г.* Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии // Бюлл. СО РАМН. 2011. №2. С.58-63.
8. *Коробова Ф.В., Левина Т.Н., Соколинский Б.З. и др.* Сравнительное исследование тромбоцитов здоровых лиц с использованием световой микроскопии и проточного счетчика Cobas Micros 18 OT // Клин. лаб. диагн. 2000. №12. С.21-24.
9. *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 // Пробл. гематол. перелив. крови. 2005. №4. С.7-16.
10. *Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И.* Практическая и лабораторная гематология / пер. с англ. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.
11. *Мазуров А.В.* Физиология и патология тромбоцитов. М.: Литтерра, 2011.
12. *Макаров М.С., Боровкова Н.В., Высочин И.В. и др.* Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике // Соврем. лаборат. 2012. №3. С.32-34.
13. *Практическая трансфузиология / под ред. Г.И. Козинца.* М.: Практическая медицина, 2005.
14. *Трансфузиология. Национальное руководство / под ред. А.А. Рагимова.* М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.
15. *Шевченко Ю.Л., Жибурт Е.Б.* Безопасное переливание крови: Руководство для врачей. СПб.: ПИТЕР, 2000.
16. *British Committee for Standards in Haematology. Blood Transfusion Task Force: Guidelines for the use of platelet transfusions // Br. J. Haematol. 2003. V.122, No.1. P.10-23.*
17. *Corash L.* Measurement of platelet activation by fluorescence-activated flow cytometry // Blood Cells. 1990. V.16, No.1. P.97-106.
18. *Delobel J., Rubin O., Prudent M. et al.* Biomarker analysis of stored blood products: emphasis on pre-analytical issues // Int. J. Mol. Sci. 2010. V.11, No.11. P.4601-4617.
19. *Egidi M.G., D'Alessandro A., Mandarello G., Zolla L.* Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics // Blood Transfus. 2010. V.8, Suppl.3. P.73-81.
20. *Kehrel B., Brodde M.* State of the art in platelet function testing // Transfus. Med. Hemother. 2013. V.40, No.2. P.73-86.
21. *Shrivastava M.* The platelet storage lesion // Transfus. Apher. Sci. 2009. V.41, No.2. P.105-113.
22. *Stroncek D.F., Rebullia P.* Platelet transfusions // Lancet. 2007. V.370, No.9585. P.427-438.
23. *Wang C., Mody M., Herst R. et al.* Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates // Transfus. Sci. 1999. V.20, No.2. P.129-139.
24. *Yardumian D.A., Mackie I.J., Machin S.J.* Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology // Journal of Clinical Pathology. 1986. V.39, No.7. P.701-712.