

ТРОМБОЦИТАРНЫЕ КОНЦЕНТРАТЫ: ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК И СТРУКТУРЫ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н. Е. Савченко»²,
ГУО «Белорусская академия последипломного образования»³,
ГНУ «Институт физиологии НАН Беларуси»⁴

В статье представлен сравнительный анализ морфологических характеристик тромбоцитов и биологических медиаторов в венозной крови и в полученной из неё обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), определены особенности структуры обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса (ОТФМ). Установлено, что ОТП характеризуется повышенным по сравнению с венозной кровью содержанием тромбоцитов в 3,9 раза, величиной тромбокрита в 2,3 раза с уменьшенным в 1,7 раза средним объемом клеток. Используемая технология эффективна для получения ОТП с высоким содержанием тромбоцитарного фактора роста-BB и ИЛ-10. По данным электронной микроскопии разрушение гранул тромбоцитов и гранулоцитов с высвобождением естественных медиаторов и цитокинов возможно определяет спектр биологических эффектов ОТФМ.

Ключевые слова: тромбоцитарные концентраты, тромбоцитарные индексы, биологические медиаторы, электронная микроскопия.

V. G. Bogdan, D. A. Tolstov, M. M. Zafranskaya, T. M. Studenikina, I. A. Melnikov, S. A. Novakovskaya

PLATELET CONCENTRATE: FEATURES OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND STRUCTURE

The article presents a comparative analysis of the morphological characteristics of platelets and biological mediators in the venous blood and received from her platelet-rich plasma (PRP), defined spatial structure of platelet-rich fibrin matrix (PRFM). It is established that is characterized by increased PRP compared with venous whole blood platelet counts 3.9 fold trombokrita value 2.3 times a concentration of homogeneous cell size reduced to 1.7 times the average volume of them. The technology used to produce effective PRP with a high content of PDGF-BB and IL-10. When electron microscopy the destruction of the granules of platelets and granulocytes to release natural mediators, growth factors and cytokines may determine the range of biological effects PRFM.

Key words: platelet concentrates, platelet indices, biological mediators, electron microscopy.

Несмотря на пристальное внимание и активный интерес исследователей к фундаментальным и прикладным аспектам изучения основных форм тромбоцитарных концентратов (ТК) отдельные вопросы нуждаются в дополнительном уточнении [2, 6, 9].

Некоторые авторы указывают на наличие существенных различий в содержании основных биологических факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов в образцах обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), получаемой по различным методикам [9]. На наш взгляд, определение концентраций тромбоцитарного фактора роста (ТФР), который является мощным стимулятором фиброгенеза и репарации тканей, регулирует секрецию и синтез коллагена и интерлейкина-10 – цитокина с выраженным противовоспалительным эффектом в ОТП позволит обосновать эффективность технологии используемой нами для её получения и целесообразность клинического применения.

Особенностью функционирования современных гематологических анализаторов является сохранение в процессе исследования стабильности клеток, что обеспечивает воспроизводимость результата [3]. Достоверно определяя не только общее количество тромбоцитов, но и тромбоцитарные индексы (ТИ), автоматические анализаторы представляют информацию о морфологических особенностях тромбоцитов [4]. ТИ являются новыми и малоизученными показателями. Именно поэтому в работах, посвященных изучению состава ТК, вопросы сравнительного анализа структурных ха-

рактеристик тромбоцитов венозной крови и полученной из неё ОТП остаются недостаточно освещенными [5].

В связи с этим, необходимо проведение современных дополнительных исследований по изучению состава и пространственной структуры обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса (ОТФМ). Использование электронной микроскопии позволяет описывать плотность фибриновых волокон как с интактными, так и активированными тромбоцитами, но результаты анализа представлены в единичных работах [7, 9].

Цель исследования

Провести анализ характера изменений показателей тромбоцитарных индексов и биологических медиаторов в венозной крови и в полученной из неё обогащенной тромбоцитами плазме, определить особенности пространственной структуры и состава обогащенного тромбоцитами фибринового матрикса.

Материалы и методы

Тромбоцитарные концентраты (ОТП, ОТФМ), полученные из периферической венозной крови, а также собственно образцы периферической крови 12 пациентов с трофическими язвами венозной этиологии, проходивших плановое лечение в отделении осложненной сосудистой патологии и гнойной хирургии УЗ «4-я городская клиническая больница им. Н. Е. Савченко» г. Минска в 2014 году.

Критерии исключения: количество тромбоцитов в образцах периферической крови менее $180 \times 10^9/\text{л}$ и более $400 \times 10^9/\text{л}$.

Технология получения ТК отражена в утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкции по применению «Метод лечения трофических язв с использованием аутологичных тромбоцитарных концентратов» (регистрационный номер 117-0912 от 28.09.2012.).

Для получения ОТП в стерильные пробирки, содержащие 1 мл 3,8% раствора цитрата натрия, набирали по 6 мл крови пациента. Проводили центрифугирование пробирок в течение 10 минут с числом оборотов 3000 в минуту, после которого в пробирках происходило разделение крови на три слоя. Средний слой собирали в отдельную стерильную пробирку.

Для получения ОТФМ в стерильные пробирки, без консерванта, набирали по 6 мл крови пациента. Затем проводили центрифугирование пробирок в течение 10 минут с числом оборотов 3000 в минуту. После центрифугирования в пробирках происходило формирование ОТФМ в виде сгустка в сыворотке крови над слоем эритроцитов.

Субмикроскопическая организация ОТФМ изучена электронно-микроскопическим методом [1]. Полученный ОТФМ погружали в фиксирующий раствор 2,5% глутарового альдегида на 2 часа при $T = 4^\circ\text{C}$. Затем материал измельчали и повторно фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия в течение 2 часов при $T = 4^\circ\text{C}$ [8]. После завершения альдегид-осмиевой фиксации материал обезжировали в спиртах восходящей крепости и заливали в капсулы аралдитом, с последующей полимеризацией в термостате при $T = 37^\circ\text{C}$ в течение 1 суток, затем при $T = 56^\circ\text{C}$ в течении 2 суток [1]. Срезы готовили на ультратоме марки LKB (Швеция), контрастировали цитратом свинца [10]. Готовые препараты просматривали на электронном микроскопе JEM 100СХ (Япония). Морфологические исследования выполнены на базе лаборатории «Центр электронной и световой микроскопии» Института физиологии НАН Беларуси.

В образцах периферической крови и в аутологичной ОТП на автоматическом гематологическом анализаторе МЕК-6410К (Nihon Kohden, Япония) определяли ТИ: ширину распределения тромбоцитов по объему (PDW – platelet size distribution width), средний объем тромбоцитов (MPV – mean platelet volume), а также общее количество тромбоцитов (PLT) и тромбокрит (PCT) – отношение объема тромбоцитов в крови (плазме) к общему объему крови (плазмы).

Количественное определение концентрации тромбоцитарного фактора роста-ВВ (ТФР-ВВ) в образцах ОТП ($n = 5$) и плазме крови ($n = 5$) проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы производства R&D Systems (США). Результаты ИФА регистрировали на спектрофотометре BRIO-SIRIO (SEAC, Италия), измеряя оптическую плотность при длине волны 450 нм.

Для определения концентрации интерлейкина-10 (ИЛ-10) в образцах ОТП ($n = 5$) и плазме крови ($n = 5$) использовали коммерческий набор ИЛ-10-ИФА-БЕСТ (область определения: 0–500 пг/мл) (Вектор БЕСТ, Россия). Все этапы исследования осуществляли в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Оптическую плотность

исследуемых образцов измеряли на спектрофотометре BRIO-SIRIO (SEAC, Италия) при длинах волн 450 нм и 620–650 нм.

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ «STATISTICA» (Version 10, StatSoft Inc., 2011).

Результаты и обсуждение

В исследование были включены образцы венозной крови пациентов с трофическими язвами венозной этиологии с уровнем тромбоцитов в рамках физиологической нормы для взрослых. В среднем содержание тромбоцитов в цельной венозной крови составило порядка $276 \times 10^9 \pm 69 \times 10^9/\text{л}$.

Однократное центрифугирование исследуемых образцов крови с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия привело к увеличению общего количества тромбоцитов в полученной плазме в 3,9 раза ($p < 0,001$) в сравнении с первичными значениями цельной крови до уровня $1066,1 \times 10^9 \pm 55,5 \times 10^9/\text{л}$, который соответствует категории ОТП (рис. 1).

Аналогичная тенденция установлена и для изменения тромбокрита. Рост количества тромбоцитов в ОТП явился основным фактором, приведшим к увеличению в ней до $0,37 \pm 0,02$ показателей тромбокрита в 2,3 раза ($p < 0,001$) по сравнению с венозной кровью $0,16 \pm 0,03$.

Проведенный сравнительный анализ отдельных показателей тромбоцитарных индексов в венозной крови и полученных из неё образцах ОТП выявил ряд особенностей. Медианные значения ширины распределения тромбоцитов по объему в исследуемых биологических субстратах были сопоставимы ($p > 0,05$) 17,5 ($17,25 \pm 17,6$) и 17,6 ($17,5 \pm 17,75$) соответственно (рис. 2).

Тогда как средний объем тромбоцитов в ОТП был меньше по сравнению с показателями в венозной крови ($5,1 \pm 0,6$ фл и $8,7 \pm 2,7$ фл., соответственно, $p < 0,001$), что вероятно связано с активностью процессов дегрануляции, происходящих при центрифугировании (рис. 3).

Одной из причин установленных закономерностей, возможно, рассматривать влияние центробежного ускорения, возникающего при центрифугировании крови, на гетерогенные по размеру и схожие по форме тромбоциты, которое приводит к разделению плазмы на слои с гомогенными по среднему объему клетками. В ходе исследования не выявлена взаимосвязь между уровнем тромбоцитов и значениями тромбоцитарных индексов цельной венозной крови и аналогичными показателями полученной из неё ОТП.

Помимо тромбоцитарных индексов проведена оценка содержания в ОТП биологических медиаторов. Эффективность используемой для получения ОТП методики подтверждена статистически значимым увеличением в 70,8 раза концентрации основного ростового фактора, активирующего пролиферацию фибробластов, стимулирующего синтез коллагена с усилением образования грануляционной ткани – тромбоцитарного фактора роста-ВВ (ТФР-ВВ) в ОТП (30122 (28744 – 31254) пг/мл) в сравнении с плазмой крови ($425,3$ ($197,4$ – $531,5$) пг/мл). Аналогичная тенденция отмечена также в отношении накопления в ОТП ИЛ-10, обладающего выражен-

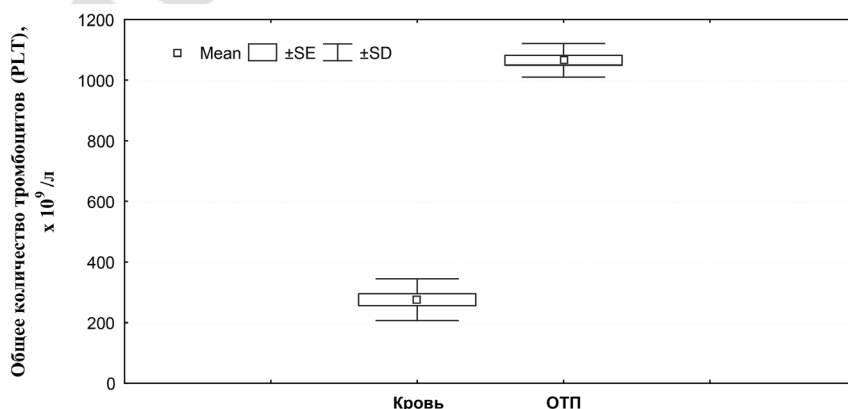


Рис. 1. Общее количество тромбоцитов (PLT) в образцах венозной крови и в полученной из неё образцах ОТП

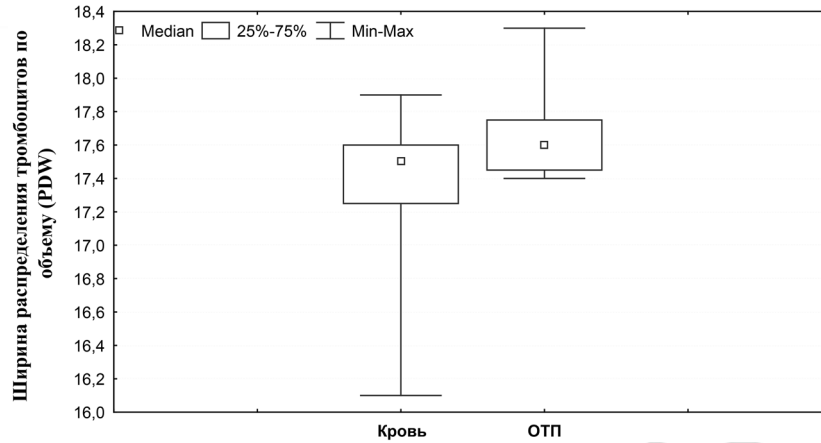


Рис. 2. Ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW) в образцах венозной крови и в полученной из неё образцах ОТП

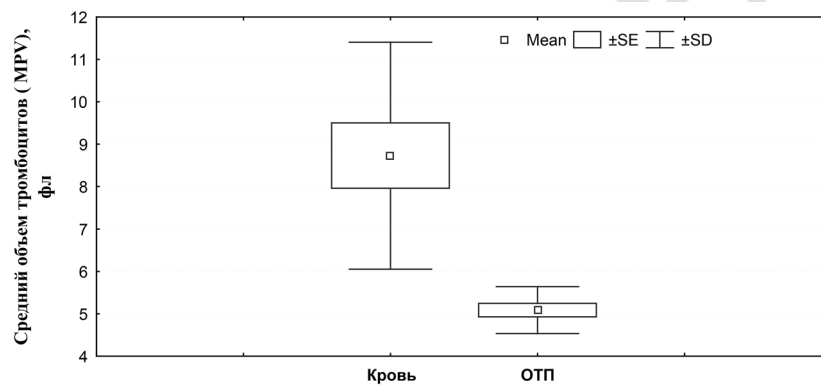
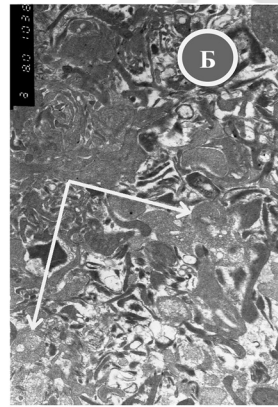


Рис. 3. Средний объем тромбоцитов (MPV) в образцах венозной крови и в полученной из неё образцах ОТП



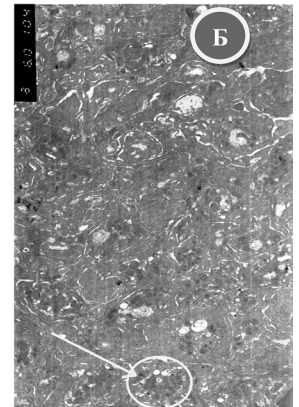
а – нити фибрина; б – тромбоциты без α -гранул

Рис. 4. Электронная микроскопия образцов ОТФМ, увеличение $\times 8000$

ным противовоспалительным эффектом, содержание которого превышало уровень в плазме крови в 2,7 раза (13,9 пг/мл и 5,1 пг/мл соответственно, при $p < 0,05$).

В результате анализа результатов электронной трансмиссионной микроскопии установлено, что ОТФМ представляет собой 3D структуру сетей нитей фибрина с включением большого количества тромбоцитов с измененной в результате центрифугирования формой и практически лишенных α -гранул (рис. 4 а, б).

Вместе с тем, в исследованных образцах сохранялись отдельные тромбоциты, содержащие определенную часть α -гранул, что указывало на определенную незавершенность процесса деграну-

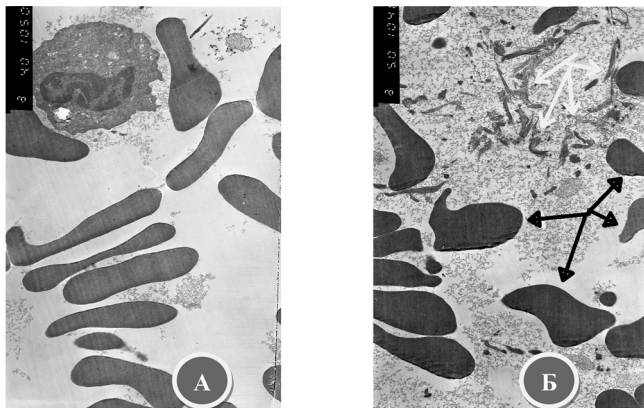


а, б – сохранившиеся α -гранулы в тромбоцитах

Рис. 5. Электронная микроскопия образцов ОТФМ, увеличение $\times 8000$ (а) и увеличение $\times 6000$ (б)

ляции и возможность продления биологических эффектов ОТФМ (рис. 5 а, б). Кроме того, клеточный состав ОТФМ помимо тромбоцитов представлен зернистыми лейкоцитами (гранулоцитами) с частично разрушенными гранулами и немногочисленными эритроцитами (рис. 6 а, б).

Присутствие гранулярных лейкоцитов с выходом биологических медиаторов, содержащихся в их гранулах, является возможным обоснованием наличия специфического действия ОТФМ связанного не только с эффектами ростовых факторов α -гранул тромбоцитов.



а – зернистый лейкоцит (гранулоцит) с разрушенными гранулами в окружении эритроцитов; б – эритроциты в нитях фибрина

Рис. 6. Электронная микроскопия образцов ОТФМ, увеличение $\times 4000$ (а) и увеличение $\times 5000$ (б)

Выводы

1. Технология однократного центрифугирования венозной крови с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия позволяет получить ОТП с высоким содержанием основного ростового фактора – тромбоцитарного фактора роста-ВВ и противовоспалительного цитокина – ИЛ-10 из образцов цельной венозной крови с содержанием в ней тромбоцитов в пределах значений физиологической нормы для взрослых.

2. Полученная в результате центрифугирования ОТП, характеризуется повышенным по сравнению с цельной венозной кровью содержанием тромбоцитов (в 3,9 раза) и величиной тромбокрита (в 2,3 раза) с гомогенными по размеру клетками с уменьшенным (в 1,7 раза) их средним объемом.

3. Содержание тромбоцитов, уровень тромбоцитарных индексов и тромбокрита в цельной венозной крови не оказывает суще-

ственного влияния на значения аналогичных показателей в ОТП, получаемой по используемой технологии.

4. Характерной особенностью структуры ОТФМ является наличие гетерогенного клеточного компонента, включающего тромбоциты, гранулярные лейкоциты и эритроциты. Разрушение гранул тромбоцитов и гранулоцитов с высвобождением естественных медиаторов, факторов роста и цитокинов возможно определяет спектр биологических эффектов ОТФМ. Замедление дегрануляции тромбоцитов обосновывает определенную пролонгацию действия ОТФМ.

Литература

1. Боголепов, Н. Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга / Н. Н. Боголепов. – М., 1976. – 71 с.
2. Богдан, В. Г. Биологические эффекты тромбоцитарных концентратов в культуре фибробластов кожи человека / В. Г. Богдан, Д. А. Толстов, С. С. Багатка, М. М. Зафранская // Медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 22-25.
3. Мининкова, А. И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов / А. И. Мининкова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 3. – С. 27-33.
4. Петрова, О. В. Значение тромбоцитарных индексов у больных, оперированных по поводу хронической ревматической болезни сердца / О. В. Петрова, С. А. Шашин, Д. Г. Тарасов // Клиническая медицина. – 2014. – № 8. – С. 20-26.
5. Пучинская, М. В. Клиническое значение тромбоцитарных индексов в кардиологии / М. В. Пучинская, А. Ю. Почтавец // Военная медицина. – 2011. – № 2. – С. 77-81.
6. Толстов, Д. А. Тромбоцитарные концентраты: классификация, технологии получения, биологические эффекты / Д. А. Толстов, В. Г. Богдан // Военная медицина. – 2012. – № 3. – С. 141-144.
7. A recently developed bifacial platelet-rich fibrin matrix / E. Lucarelli [et al.] // European cells and materials. – 2010. – Vol. 20. – P. 13-23.
8. Millonig, G. Advantages of a Phosphate Buffer for OsO_4 Solutions in Fixation / G. Millonig // J. Appl. Physics. – 1961. – Vol. 32, № 8. – P. 1637.
9. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features / D. M. Dohan [et al.] // Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod. – 2006. – Vol. 101. – P. 45-50.
10. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17, № 2. – P. 208-210.