

Materials digest of the International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences (London, August 16 – August 23, 2012). Modern Medicine and Pharmaceuticals: actual Problems and Prospects of Development. – London, LASHE. – 2012. – 136 p. P. 36 – 40.

УДК 612.111.7

К вопросу о размножении тромбоцитов *in vitro*

С.А. Кондрашев

КП Луганская станция переливания крови – областной центр службы крови (главный врач – Е.В. Фролова) Луганск, Украина

*Данные проведенных исследований показали, что существует возможность размножения тромбоцитов *ex vivo* при условии помещения их в суспендирующую среду аутоплазмы или официального дополнительного раствора для хранения тромбоцитов.*

Ключевые слова: размножение, тромбоцит, морфометрические показатели

Вступление

Исследования последних лет доказали, что тромбоциты обладают способностью к размножению. Этот процесс отличается от процесса деления клеток, имеющих ядро: проведя ряд экспериментов, ученые обнаружили, что тромбоциты размножаются путем а) почкования, б) удлинения клеток с их поперечным делением и образованием цепочек. Изучение полученных новых структур показало их полную идентичность родительским клеткам, как по морфологии, так и по функциональной активности [11,21,27]. Кроме того, исследователи наблюдали процессы образования цепочек тромбоцитов в компонентах донорской крови, где клетки сохраняли способность к размножению в течение нескольких суток после заготовки [28]. Это открывает новые возможности для трансфузионной медицины, поскольку эффективность применения содержащих тромбоциты компонентов донорской крови зависит от количества клеток в дозе, а также удельного веса функционально полноценных («юных», «зрелых») форм. Способность тромбоцитов к размножению проявляется при наличии определенных условий, в том числе наличии в окружающей среде биологически активных веществ, необходимых для построения новых клеток [10,26,28].

Цель настоящего исследования – определение возможности размножения тромбоцитов *in vitro* во взвеси, приготовленной с использованием аутологичной плазмы и

суспендирующего раствора SSP+, без создания дополнительных условий для их культивирования.

Материал и методы исследования

Исследовали взвесь тромбоцитов, выделенную из венозной крови группы 0(I) 26-ти доноров-мужчин в возрасте 20-36 лет. Взвесь готовили в асептических условиях с учетом минимизации адгезии кровяных пластинок: был исключен контакт последних с лабораторным стеклом. Использованы контейнеры из поливинилхлорида с гемоконсервантом «CPDA-1» производства ZPSM «RAVIMED», Польша; суспендирующий раствор SSP+ производства «MacoPharma Mouvaux», Франция; изготовленные из полистирола стерилизованные радиационным методом пробирки (Spektar, Сербия) и наконечники к микродозаторам (Thermo Electron Oy, Финляндия).

Взяты в опыт: группа образцов 1 – тромбоциты, взвешенные в 100%-ной аутологичной плазме; группа образцов 2 – тромбоциты во взвешивающем растворе SSP+ с 20% аутологичной плазмы. Тестирование образцов, хранившихся при температуре $+(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в настольном устройстве встряхивания пластинок HELMER системы хранения тромбоцитов PC100 (HELMER LABS, USA and CANADA), осуществлялось в течение 5-ти суток с момента заготовки, ежедневно.

Морфометрический контроль тромбоцитов в обеих группах образцов осуществлялся на основании показателей автоматического гематологического анализатора: HB-7021 (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай), включающих параметры: среднее количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму (PDW).

Уровень холестерина во взвешивающей тромбоциты среде определяли с использованием набора реактивов «Холестерин» (НПП «Филисит-диагностика», Украина).

Уровень общего белка определяли с использованием набора реактивов «Общий белок» (НПП «Филисит-диагностика», Украина).

Морфологические исследования тромбоцитов осуществлялись с использованием микроскопа для морфологических исследований MICROmed XS-3330 (Ningbo Shenghend Optics & Electronics Co., LTD, Китай), цветной цифровой видеокамеры SAMSUNG SCC-B1011 (Samsung Electronics, Корея), увеличение в 1600 крат. Окраска тромбоцитов в мазках производилась по А. Фонио [12]. Снимки были сделаны на 3-и сутки наблюдения.

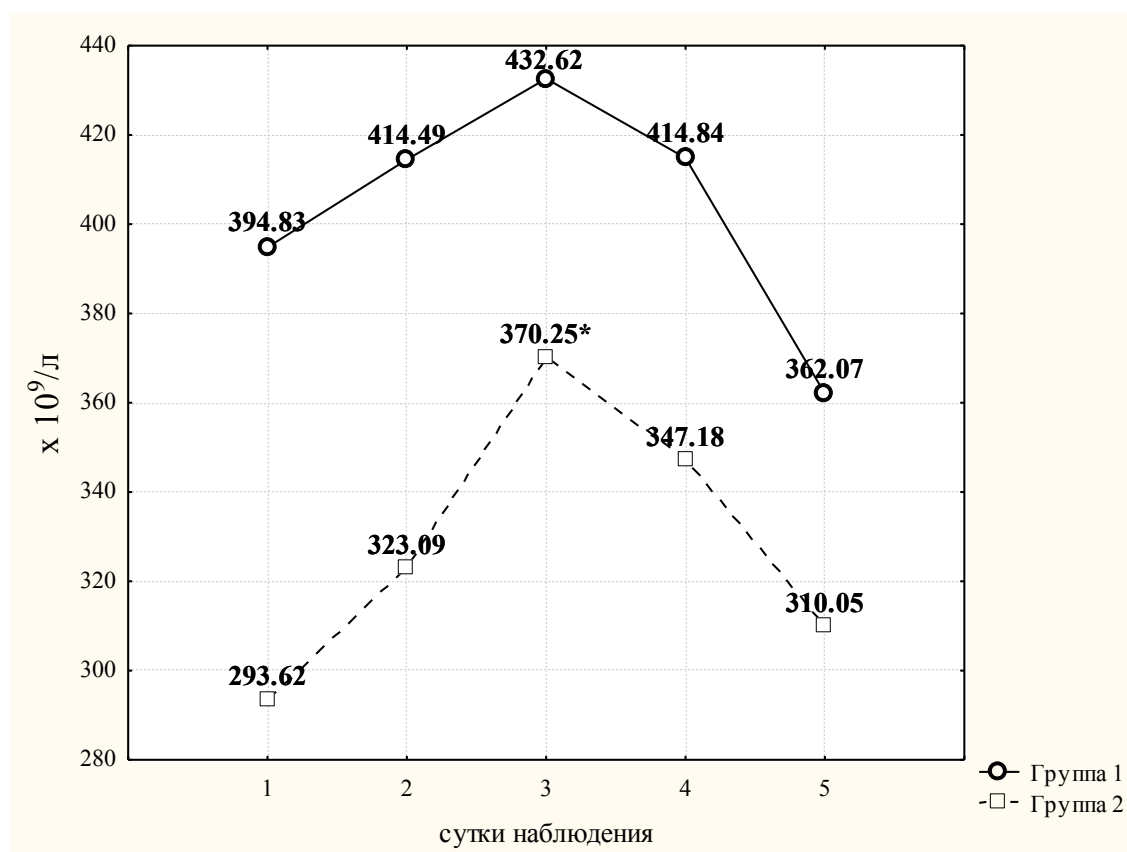
Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программы Statistica v.8. Для оценки достоверности различий в сравниваемых показателях использовали

критерий Стьюдента-Фишера. Статистическую связь между рядами признаков определяли при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена по Л.Е. Полякову (1971).

Результаты исследований и их обсуждение

В момент заготовки среднее значение PLT составило в группе образцов 1 $(394,83 \pm 27,35) \cdot 10^9/\text{л}$, в группе образцов 2 $(293,62 \pm 18,78) \cdot 10^9/\text{л}$, что соответствует параметрам тромбоконцентрата, применяющегося для оказания трансфузиологического пособия больным, а именно от $200 \cdot 10^9$ до $800 \cdot 10^9$ тромбоцитов [16,17].

При исследовании образцов 1-й группы выявлена устойчивая тенденция к росту числа клеток в течение первых 3-х суток (рис. 1). В образцах 2-й группы установлен статистически значимый рост числа клеток ($p=0,0298$).



Примечание: * отличия достоверны в сравнении с показателем 1-х суток наблюдения, $p < 0,05$

Рисунок 1. Среднее число тромбоцитов, взвешенных в аутоплазме (группа 1) и SSP+ (группа 2), на протяжении срока наблюдения

Достигнув пика на 3-и сутки (рост на 8,7%), показатель PLT в 1-й группе образцов снижался: в 4-е сутки – на 4,1% относительно наивысшего значения, и далее к 5-м суткам – на 16,3%. Относительно момента заготовки к концу срока наблюдения снижение числа клеток составило 8,3%. Очевидно, «старые» клетки, попавшие в образцы в момент их

заготовки, и образовавшиеся из «зрелых» в процессе хранения образцов, разрушались, что и обусловило снижение PLT.

В образцах группы 2 повышение количества тромбоцитов было более значимым на 2-е сутки, чем в группе 1 (5,0% против 10,0%) и еще более интенсивным на 3-и сутки (4,4% против 14,6%). К концу срока наблюдения число клеток по сравнению с наибольшим показателем как в 1-й, так и во 2-й группе образцов снизилось на 16,3%. Установлено, что в группе 1 на 5-е сутки наблюдения среднее число тромбоцитов снизилось по отношению к исходному показателю на 17,4%. В группе 2, напротив, число тромбоцитов возросло на 5,6%.

Учитывая данные литературы, можно предположить, что повышение числа клеток в образцах может быть обусловлено: а) трансформацией в тромбоциты гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и циркулирующих в кровеносном русле мегакариоцитов и протромбоцитов, возможно, имеющих в образцах в числе остаточных после центрифугирования клеток донорской крови [1,2]; б) размножением тромбоцитов *in vitro*.

Известно, что ГСК циркулируют в кровеносном русле человека в количестве 1:100000 клеток крови [9]. В выделенном из донорской крови тромбоконцентрате имеет место остаточное количество лейкоцитов ($0,05-0,2 \cdot 10^9/\text{л}$) [6,15] и незначительное количество эритроцитов. Следовательно, теоретически ГСК также могут попадать в исследуемый материал, несмотря на то, что диаметр гемопоэтических стволовых клеток (около 6,5 мкм) превышает таковой у тромбоцитов (2-4 мкм) [4,13]. Однако можно предположить, что при дифференциальном центрифугировании большая часть ГСК будет удалена вместе с эритроцитами и лейкоцитами.

Кроме того, развитие и дифференцировка ГСК регулируются специфическим микроокружением и гемопоэтическими ростовыми факторами, которые включают, в частности, цитокины (IL-3, IL-6, IL-11), гормоны (тромбопоэтин) [5,14]. Возможности использования данных стимулов для продукции дифференцированного, функционального потомства ГСК практически лишены в группе образцов 2, так как сохранено лишь 20% аутоплазмы, в то время как микроокружение клеток в образцах группы 1 (100%-ная аутоплазма) может содержать определенное количество указанных факторов. Однако результаты исследований показали нарастание количества тромбоцитов, более интенсивное в группе образцов 2. Следовательно, стволовые клетки не могут быть источником новых тромбоцитов, появление которых в образцах очевидно.

По мнению Л.И. Бурячковской (2007), циркулирующие в кровеносном русле мегакарициты из донорской крови способны к тромбоцитопоезу [2]. Однако а) в искусственной среде полимерного контейнера отсутствуют сдвиговые моменты (циркуляция крови *in vivo*), имеющие место, например, в капиллярах легких, где происходит физическая

фрагментация цитоплазмы мегакариоцитов по причине значительной разницы между диаметром сосудов и размером клетки (последняя значительно больше) [31]. Кроме того, дифференциальное центрифугирование удаляет из тромбоконцентрата такие большие клетки, как мегакариоциты, что нашло подтверждение при микроскопии взвеси консервированных тромбоцитов.

Л.И. Бурячковская утверждает также, что мегакариоциты костного мозга выбрасывают длинные (до 150 мкм) цитоплазматические тяжи, проникающие через костно-мозговые синусы в просвет сосудов, где отделяются от материнской клетки (протромбоциты). Последние поступают в кровоток и уже в циркуляции распадаются на отдельные тромбоциты [3]. В нашем исследовании при микроскопии протромбоциты найдены не были.

Таким образом, была принята рабочая гипотеза о размножении кровяных пластинок *in vitro*. Она косвенно подтверждается тем, что средний объем исследуемых тромбоцитов в начале наблюдения имел тенденцию к увеличению (известно, что «юные» тромбоциты имеют больший объем, чем «зрелые» [4]), а к 5-м суткам (в группе образцов 2 – к 3-м суткам) возрос достоверно (табл. 1).

Таблица 1

MPV во взвеси тромбоцитов, фл

Сутки наблюдения	Взвешивающая среда	
	Аутоплазма	SSP+ +20% аутоплазмы
1	7,79±0,082	7,61±0,081
2	7,75±0,067	7,70±0,071
3	7,92±0,069	8,03±0,139*
4	8,03±0,100	8,64±0,227*
5	8,57±0,119*	8,89±0,225*

Примечание: * отличия достоверны в сравнении с показателем 1-х суток наблюдения, $p < 0,05$

На 4-е сутки отмечено статистически значимое различие в MPV между образцами 1-й и 2-й групп (8,03 и 9,47 фл, соответственно). Выявленная динамика MPV требует объяснения. Популяция тромбоцитов, изначально помещенная в пробирку, на 92,5-97,4% [4] состоит из «зрелых» и «старых» клеток, подверженных процессу «platelet storage lesion» (повреждение во время хранения) [20,24,30]. Содержащихся в данной популяции «юных» клеток (до 0,8%) недостаточно для того, чтобы при их трансформации в «зрелые» к 5-м суткам сохранилось значительное количество тромбоцитов и возрастал их объем, что имело место в нашем исследовании. Поэтому можно предположить, что «зрелые» клетки претерпевали возрастные изменения (следовательно, уменьшались в объеме) [4], а «старые» разрушались по мере хранения образцов, и их нишу заполняли более крупные «потомки», что особенно заметно в

группе образцов 2. В связи с изложенным можно утверждать, что *in vitro* имело место именно размножение тромбоцитов. Репродуцирование было более интенсивным в группе образцов 2, возможно, по причине отсутствия во взвешивающей среде SSP+ гуморальных ингибиторов тромбопоэза, имеющих место в плазме крови человека [29].

Известно, что появление новой клетки предусматривает синтез ее составляющих. Для того чтобы подтвердить или отрицать расходование из взвешивающей среды «строительного материала» для новых тромбоцитов, нами был выбран показатель уровня холестерина, как обязательной составляющей клеточной мембраны, и общего белка, поскольку кровяные пластинки обладают способностью включать белки в цитоплазму и гранулы путем эндоцитоза [8].

Изучили динамику показателя уровня холестерина и общего белка в суспендирующей среде на этапах наблюдения (табл. 2).

Таблица 2

Уровень холестерина, ммоль/л, и общего белка, г/л

Сутки наблюдения	Холестерин		Общий белок	
	Группа 1	Группа 2	Группа 1	Группа 2
1	4,504±0,296	0,935±0,134	60,006±2,736	27,113±1,173
2	4,226±0,366	0,807±0,091	53,690±1,635	24,913±1,125
3	4,128±0,312	0,718±0,050	51,826±2,331*	21,699±0,797*
4	4,450±0,307	0,927±0,138	52,221±1,242	25,287±1,155
5	4,832±0,431	1,029±0,144	53,628±0,622	25,164±1,114

Примечание: * отличия достоверны в сравнении с показателем 1-х суток наблюдения, $p < 0,05$

Установили, что на протяжении 3-х суток в обеих группах образцов уровень холестерина имел тенденцию к снижению, после чего нарастал к концу срока наблюдения. При исследовании уровня общего белка отмечено статистически значимое снижение данного показателя к 3-м суткам, и дальнейшее его повышение к 5-м суткам. Очевидна эвентуальность расходования данных биологически активных веществ в процессе рождения новых клеток. Возрастание же содержания холестерина и белка в конце срока наблюдения, с нашей точки зрения, связано с разрушением клеток в процессе «platelet storage lesion».

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW) в каждый день наблюдения в обеих группах образцов к 4-м суткам значимо увеличивалась (с 10,34% до 11,02% в 1-й группе образцов и с 10,31% до 11,74% во 2-й группе), что подтверждает наличие в популяции крупных и мелких клеток. К 5-м суткам показатель PDW возрос до 11,80% и 12,91%, соответственно.

Предположение о размножении тромбоцитов *in vitro* потребовало микроскопического подтверждения. В образцах обеих групп нами были выявлены признаки этого процесса,

описанные в литературе, – почкование тромбоцитов; тромбоциты в виде палочек, имеющих в центре оптическое уплотнение, впоследствии размножающихся поперечным делением; образование цепочек, состоящих из 3-х – 10-ти клеток (рис. 1,2).

Нам также удалось зафиксировать на снимках связь кровяных пластинок с эритроцитами и лейкоцитами (рис. 3,4,5,6), охарактеризованную М.В. Лифановским и В.А. Ульман как «паразитирование» тромбоцитов с использованием кислорода гемогрупп, аминокислот эритроцитов, биологически активных веществ цитоплазмы лейкоцитов [11].

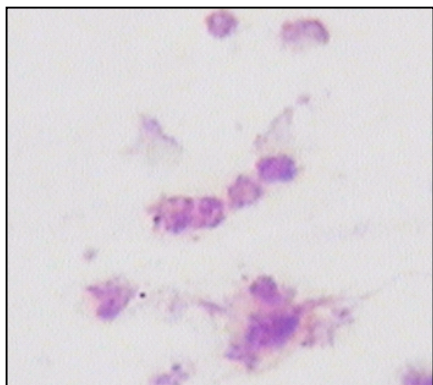


Рис. 1. Деление и почкование (внизу) тромбоцитов

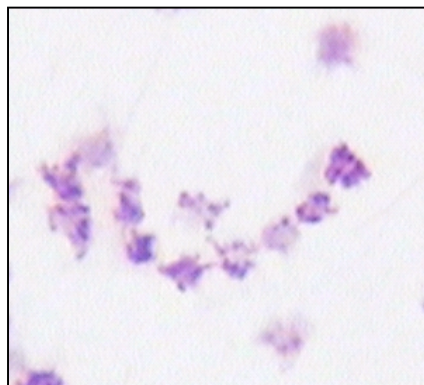


Рис. 2. Тромбоциты в цепочке из 10-ти клеток

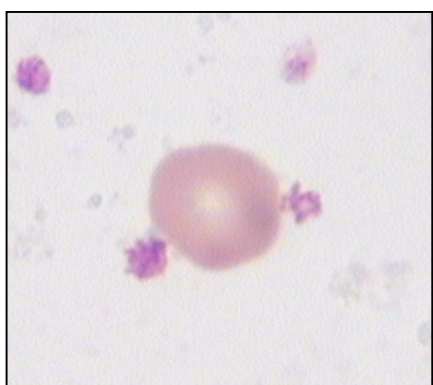


Рис.3.
Рис. 3. Тромбоцит в связи с эритроцитом

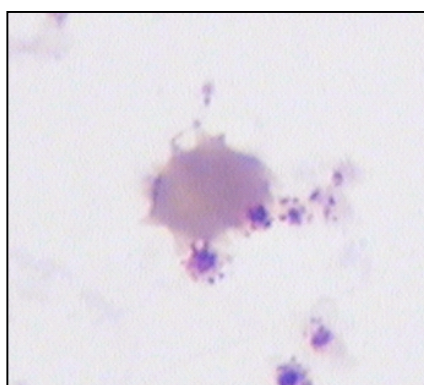


Рис. 4. Образование цепочки тромбоцитов, изменение формы эритроцита

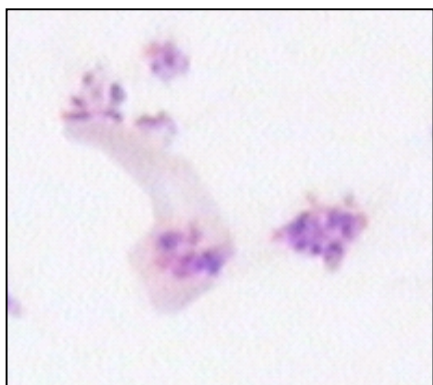


Рис. 5. Эритроцит разрушается, тромбоциты

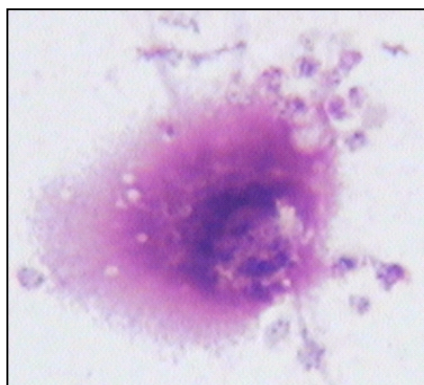


Рис. 6. Выход развившихся в лейкоците

Мы предлагаем альтернативный вариант взаимодействия клеток в тромбоконцентрате. Известно, что так называемые «профессиональные» фагоциты (в том числе клетки крови) обладают уникальными сенсорами, расположенными на поверхности клеток и имеющими прямую связь с механизмом апоптоза [7]. Фосфатидилсерин на поверхности апоптической клетки улавливают фагоциты, имеющие ЛПНП-рецепторы, CD14, β_2 -гликопротеин 1 и gas-6. Присоединяясь посредством указанных рецепторов к ФС, они осуществляют поглощение вошедшей в апоптоз клетки посредством макропиноцитоза [22]. В настоящее время изучаются апоптические процессы в безъядерных клетках. Установлено, что суицидальная программа эритроцитов (eryptosis) сопровождается везикуляцией мембраны, активацией протеаз и появлением фосфатидилсерина на внешнем монослое мембраны [25]. Известно также, что тромбоциты обладают такими сенсорами фосфатидилсерина, как ЛПНП-рецепторы, CD36 и gas-6 [18,19,23]. Учитывая изложенное, можно предположить, что тромбоциты не паразитируют на эритроцитах, иначе такой процесс приводил бы к катастрофической анемизации организма, но распознают эритроциты в стадии эриптоза, осуществляют таксис (фосфатидилсерин является аттрактантом), и после присоединения подвергают пиноцитозу содержимое клетки, что становится возможным вследствие деструктивных изменений мембраны эритроцита.

Выводы

Выбранные для сравнения взвешивающие среды для заготовки тромбоцитов человека (аутологичная плазма и ресуспендирующий раствор SSP+) обеспечивают не только сохранность морфометрических показателей тромбоцитов в течение 5-ти суток хранения, но и увеличение числа клеток в первые 3-е суток. Микроскопически подтверждена связь кровяных пластинок с эритроцитами и лейкоцитами, возможно, с использованием клеточных составляющих данных форменных элементов крови путем эндоцитоза.

Литература

1. Бенедь О.О. Стовбурові клітини, їх використання в практичній медицині. – Режим доступу: http://www.transplantology.com/index.php?option=com_content&task=view&id=388&Itemid=42
2. Бурячковская Л.И. Гетерогенность тромбоцитов человека и животных, связь морфологических особенностей с функциональным состоянием: автореф. дис. . д-ра биол. наук / Л. И. Бурячковская. М. 2007. 44 с.
3. Бурячковская Л.И., Учитель И.А., Рогова Э.М. Особенности циркулирующих биполярных протромбоцитов и их роль в организме // Кардиол. вестн. – 2008. – Т. 3, №1 . – С. 39-48.

4. Гайдукова С.М., Видиборець С.В. Тромбоцитози в лікарській практиці // Мистецтво лікування. – 2004. – №10. – С. 16-18.
5. Гривенников И.А. Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки // Успехи биологической химии. – 2008. – Т. 48. – С. 181-220.
6. Жибурт Е.Б., Коденев А.Т., Ващенко Г.А., Капустов В.И. Совершенствование получения концентрата тромбоцитов // Вестник службы крови России. – 2010. – N 2. – С.22-25.
7. Кайдашев И.П. Роль апоптоза в развитии аутоиммунных заболеваний // Здоровье Украины. – 2008. – №6(7). Режим доступа: <http://immuno.health-ua.com/article/243.html>
8. Коркушко О.В., Лишневская В.Ю. Тромбоциты: физиология, морфология, возрастные и патологические особенности, антитромбоцитарная терапия. – Киев: Медкнига, 2011. – 240с.
9. Космачёва С.М., Волк М.В., Потапнев М.П. Стволовые клетки взрослых: проблемы получения, дифференцировки in vitro, перспективы клинического применения // Медицинские новости. – 2008. – №9. – С. 5-9.
10. Лифановский В.А. Способ получения тромбоцитов / Патент Р.Ф. №2068265, 1992г. – Режим доступа: <http://www.hemostas.ru/society/publications/p9.shtml>
11. Лифановский М.В., Ульман В.А. Размножение тромбоцитов? / Калининград: Калинингр. кн. изд-во, 1994. – 71с.
12. Медицинские лабораторные технологии: [Справочник] / Под ред. Карпищенко А.И. – Санкт-Петербург, «Интермедика», 1998. – Том 1. – 407 с. (С. 309)
13. Общероссийская общественная организация российская ассоциация трансфузиологов. Донорская кровь и ее компоненты: характеристики и контроль качества. XVII. Гемопоэтические стволовые клетки. Стандарт орг-и 17, дата принятия 01.04.2005. – Режим доступа: [transfusion.ru > rat/doc/doc17.pdf](http://transfusion.ru/rat/doc/doc17.pdf)
14. Онищенко НА., Крашенинников М.Е. Современные представления о биологии стволовых клеток костного мозга и крови в аспекте их клинического применения // Вестн. трансплантол. и искусственн. органов.- 2004. – №3. – С.54-62.
15. Порядок контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові, її компонентів. Мет. рекомендації, затв. Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 9 березня 2010 року N 211. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 8 червня 2010 р. за N 368/17663.
16. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови / Пер. с англ. – Милан: Европейская школа трансфузионной медицины. – 2000. – 1055 с. (С. 604)
17. Чугрієв А.М., Терещук Т.О. Контроль якості концентрату тромбоцитів, отриманого методом переривчастого аферезу // Гемостаз – проблеми та перспективи: Матеріали II міжнародного симпозіуму (8-9 листопада 2006р.). – Київ, 2006. – Гематологія і переливання крові.– 2006. – №33. – С. 148. – Режим доступу: www.nbuv.gov.ua/portal/Chem_Biol/Gipk/2006_33/II/06cammpa.pdf
18. Angelillo-Scherrer A., Burnier L., Flores N. et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy // J. Clin. Invest. – 2005. – 115(2). – P. 237-246.
19. Cserti-Gazdewich C.M., Dzik W.H., Dorn M.E. et al. Quantitation of CD36 (platelet glycoprotein IV) expression on platelets and monocytes by flow cytometry: application to the study of Plasmodium falciparum malaria // Cytometry B.Clin. Cytom. – 2009. – № 76(2). – P. 127-34.
20. Devine D.V., Serrano K. The Platelet Storage Lesion // Clin. Lab. Med. 2010 V. 30. – №2. – P. 475-487.
21. Helbig W. Effect of polyenyl phosphatidylcholines on thrombocyte adhesiveness and thrombocyte propagation in vitro // Z. Gesamte Inn. Med. – 1974. – №29(11). – P. 456-459.
22. Henson P.M., Bratton D.L., Fadok V.A. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2001. – №2. – P. 627-633

23. Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, Resar JR. Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective. *Int. J. Endocrinol.* 2011. – V. 54(4). – P. 1117-1123.
24. Kaufman R. M. Platelets: Testing, Dosing and the Storage Lesion—Recent Advances // *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006. – P. 492-496.
25. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C. et al. Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death // *Cell Physiol. Biochem.* – 2005. – Vol. 15. – P. 195-202.
26. Moake J. Platelets in bloom // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, Issue 18. – P. 3650-3651.
27. Schwertz H., Blaylock R.C., Kraiss L. W. et al. Terminally-differentiated anucleate platelet progeny <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Terminally-defferentiated-anucleate-platelet-progeny/WO2010042179A1.pdf>
28. Schwertz H., Köster S., Kahr W. H. A. et al. Anucleate platelets generate progeny // *Blood.* – 2010. – №115. –3801-3809
29. Shreiner D.P., Weinberg J., Enoch D. Plasma thrombopoietic activity in humans with normal and abnormal platelet counts // *Blood.* – 1980. – V. 56. – P. 183-188.
30. Thon JN, Devine DV. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets // *Transfusion.* – 2007. – №47(12). – P. 2260–2270.
31. Trowbridge E.A., Martin J.F., Slater D.N. Evidence for a theory of physical fragmentation of megakaryocytes, implying that all platelets are produced in the pulmonary circulation // *Thromb Res.* – 1982. – V. 28. – P.461– 475.

С.О. Кондрашев. До питання про розмноження тромбоцитів *in vitro*. Луганськ, Україна.

Ключові слова: розмноження, тромбоцит, морфометричні показники

Дані проведених досліджень показали, що існує можливість розмноження тромбоцитів *ex vivo* за умови вміщення їх у суспендуюче середовище аутоплазми або офіціального додаткового розчину для зберігання тромбоцитів.

S.A. Kondrashev. To the question about platelet reproduction *in vitro*. Lugansk, Ukraine.

Key words: reproduction, platelet, morphometric indexes

There is possibility of reproduction of platelets *ex vivo* under putting them in the suspending medium of autoplasm or officinal additional solution at deposit of platelets as it was shown by carried out researches.

Сведения об авторе: Кондрашев Сергей Александрович, врач отдела производства препаратов крови Луганской областной станции переливания крови
г. Луганск, ул. Краснодонская, 10
тел. (0642)50-70-56
e-mail dialug@mail.ru