

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасва, 2010
УДК 591.111.01

Тромбоциты человека: оценка альтернативных взвешивающих сред для их хранения

П.Н.Малыш, С.А.Кондрашев, В.Я.Гусакова, Н.Б.Щеголева

Главное управление здравоохранения Луганской областной государственной администрации, Луганская областная станция переливания крови
Луганск, Украина

Настоящая работа направлена на поиск возможностей повышения качества одного из наиболее востребованных компонентов донорской крови — тромбоконцентрата — путем выбора адекватной среды для сохранения его нативных свойств. Проведенные исследования показали, что аутологичная среда взвешивания тромбоцитов, а именно собственная плазма крови донора, является более физиологичной, чем среда искусственного взвешивающего раствора. Она более эффективно сохраняет электролитный баланс и, соответственно, морфометрические характеристики тромбоцитов человека *in vitro* с использованием пластиковой лабораторной посуды, а следовательно, и в искусственном окружении пластикового контейнера для хранения тромбоконцентрата.

Ключевые слова: тромбоцит, плазма, суспендирующий раствор.

Введение

На современном этапе развития трансфузионной медицины высокое качество компонентов донорской крови — основное требование, предъявляемое к этим главным средствам трансфузиологического пособия больным и пострадавшим в катастрофах природного и техногенного характера. Одним из наиболее востребованных компонентов крови является тромбоконцентрат, использующийся в первую очередь в онкологической и гематологической практике.

Известно, что качество тромбоконцентрата зависит от количества клеток в компоненте (соответственно, тромбокрита), а также удельного веса функционально полноценных (юных, зрелых) форм тромбоцитов. Следовательно, выбор среды, обеспечивающей долгосрочное (как минимум в течение 5 суток) сохранение тромбоцитов в состоянии, близком к исходному, имеет важное практическое значение.

Целью исследования был выбор адекватной среды для сохранения нативных свойств выделенных из донорской крови тромбоцитов. Для решения поставленной проблемы проведен сравнительный анализ морфометрических показателей тромбоцитов во взвеси, приготовленной с использованием аутологичной плазмы и ресуспендирующего раствора, а также показателей баланса электролитов в указан-

ных взвешивающих средах на протяжении срока наблюдения.

Материалы и методы исследования

Исследовали взвесь тромбоцитов, выделенную из венозной крови группы 0(I) 20 доноров-мужчин в возрасте 20-36 лет. Взвесь готовили с учетом минимизации адгезии кровяных пластинок: был исключен контакт последних с лабораторным стеклом. В опыте использованы контейнеры из поливинилхлорида с гемоконсервантом «CPDA-1» производства ZPSM «RAVIMED», Польша; суспендирующий раствор, приготовленный по рецептуре «SSP» производства «MacoPharma Mouvaux», Франция (взвешивающие растворы для хранения тромбоцитов в Украине не зарегистрированы); изготовленные из полистирола и стерилизованные радиационным методом пробирки (Spektar, Сербия) и наконечники к микродозаторам (Thermo Electron Oy, Финляндия).

Взяты в опыт: 1 группа образцов — тромбоциты, взвешенные в аутологичной плазме; 2 группа образцов — тромбоциты во взвешивающем растворе.

Морфометрический контроль тромбоцитов в обеих группах образцов осуществлялся на основании показателей автоматического гематологического анализатора ABX Micros 60

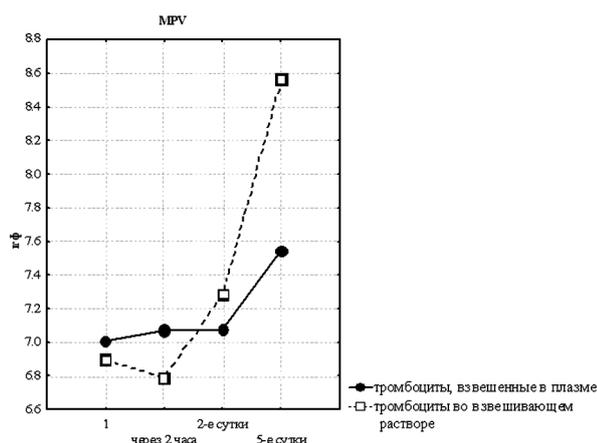


Рис. 1. Средний объем тромбоцитов во взвеси (MPV).

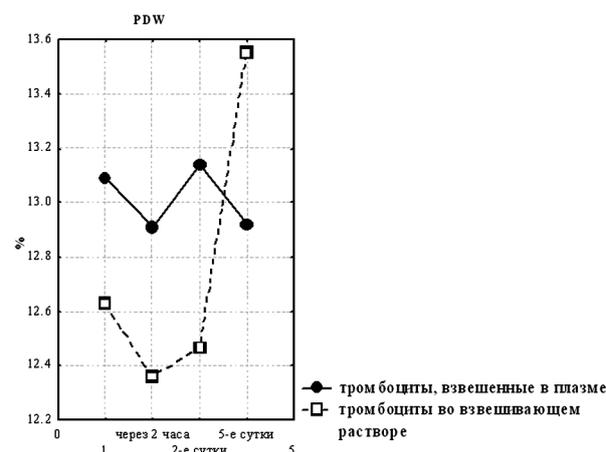


Рис. 2. Показатель гетерогенности тромбоцитов (PDW).

ОТ, включающих четыре параметра: количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), тромбокрит (PCT) или, в настоящем случае, доля объема тромбовзвеси, занимаемая в образце тромбоцитами; относительная ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW).

Уровень общего кальция в суспендирующих тромбоциты средах определяли фотометрически при длине волны 580 нм в кюветках 1x1 см (Spektar d.o.o., Сербия) с использованием «Набора реактивов для определения общего кальция в биологических жидкостях» производства фирмы «Филисит-диагностика» (г. Днепропетровск, Украина). Учитывая то, что наличие в составе гемоконсерванта «CPDA-1» неорганического фосфата может влиять на результаты детекции Ca^{2+} вследствие образования соединения Ca^{2+} с цитратом натрия/лимонной кислотой, использовали растворы сравнения — стандартный образец Ca, обработанный указанным гемоконсервантом смешиванием в соотношении 7:1.

Определение концентрации катионов магния проводили с помощью диагностического набора «Но k Magnesium Магний (Mg 208)» («BIO-LA-TEST», Чехия) фотометрически при длине волны 540 нм.

Результаты детекции катионов кальция и магния учитывали с помощью анализатора биохимического фотометрического кинетического АБхФк-02-«НПП-ТМ» БиАн (НПП «Техномедика», Россия).

Морфологические исследования тромбоцитов осуществлялись при помощи микроскопа для морфологических исследований MICROmed XS-3330, цветной цифровой видеокамеры SAMSUNG SCC-B1011, увеличение в 1600 крат. Окраска тромбоцитов в мазках производилась по А.Фонио [4].

Тестирование образцов, хранившихся при температуре от $+18^{\circ}\text{C}$ до $+20^{\circ}\text{C}$, осуществлялось в момент заготовки, через два часа после заготовки, через сутки и на 5-е сутки хранения.

Результаты исследования и их обсуждение

Расчет содержания тромбоцитов в образцах, приготовленных для сравнительного исследования, показал, что выборочное среднее значение PLT в обеих группах образцов составило $(334,29 \pm 36,64 - 407,52 \pm 40,75) \cdot 10^9/\text{л}$, что соответствует параметрам тромбоконцентрата, заготовленного с использованием сепаратора клеток крови, а именно от $200 \cdot 10^9$ до $800 \cdot 10^9$ тромбоцитов [6,7].

Данные литературы свидетельствуют о том, что существует четкая зависимость между «возрастом» тромбоцитов и их размерами. Так, юные формы тромбоцитов отличаются от зрелых величиной (более 4 мкм), диаметр зрелых форм составляет 2-4 мкм, старых — менее 2 мкм [2, 3].

В нашем опыте было установлено, что в момент заготовки образцов средний объем тромбоцитов составлял: в образце №1 — $7,01 \pm 0,104$ фл, в образце №2 — $6,9 \pm 0,124$ фл, что не имело достоверных различий ($p=0,4993$), так же как через два часа ($7,07 \pm 0,117$ фл и $6,79 \pm 0,123$ фл соответственно; $p=0,1073$) и через сутки после заготовки: объем тромбоцитов 2 группы был равен $7,08 \pm 0,149$ фл, в то время как в 1 группе образцов — $7,29 \pm 0,163$ фл ($p=0,3471$). Однако на 5-е сутки наблюдения данный показатель составил для тромбоцитов в образцах 1 группы $7,55 \pm 0,232$ фл, в то время как для тромбоцитов 2 группы — $8,56 \pm 0,302$ фл, что свидетельствует о достоверном различии ($p=0,0149$) (рис. 1).

Динамика уровня катионов кальция и магния во взвешивающей среде на протяжении срока наблюдения

Катион	Сутки наблюдения			
	1-е		5-е	
	ммоль/л, 1 группа образцов	ммоль/л, 2 группа образцов	ммоль/л, 1 группа образцов	ммоль/л, 2 группа образцов
Mg ²⁺	0,798±0,011	0,737±0,006	0,788±0,007	0,708±0,010
Ca ²⁺	2,051±0,335	0,998±0,051	2,157±0,144	1,202±0,041

Объем тромбоцитов, взвешенных в собственной плазме, возрос относительно исходного показателя на 7,7%, в то время как увеличение объема тромбоцитов в суспендирующем растворе составило 24,1%. «Возрастзависимое» изменение объема тромбоцитов было подтверждено показателем PDW, так как между этим показателем и MPV существует прямая (но не линейная) зависимость [1]. Было установлено: если в 1-е и 2-е сутки хранения взвеси тромбоцитов значение показателя гетерогенности клеток в 1 группе образцов составляло (и не имело достоверных различий, $p=0,8905$) 13,09% и 13,14% соответственно, во 2 группе — 12,63% и 12,47% ($p=0,6515$), то на 5-е сутки в 1 группе образцов была установлена тенденция к снижению данного показателя относительно исходного уровня (на 1,3%, $p=0,6947$), в то время как во 2 группе имела место тенденция к его повышению (на 7,28%, $p=0,1661$) (рис. 2).

Незначительное снижение PDW в 1 группе образцов можно объяснить естественным «старением» тромбоцитов в аутологичной взвешивающей среде, которой является собственная плазма донора, в то время как некоторое повышение данного показателя в искусственной среде суспендирующего раствора потребовало выяснения причин.

Известно, что наибольшими размерами (от 7 до 12 мкм) и, соответственно, объемом облада-

ют так называемые «тромбоциты раздражения», возникающие *in vivo* по причине тромбоцитопении различного генеза [9]. Однако в условиях искусственной среды *in vitro* выделенных из донорской крови тромбоцитов отсутствует источник возникновения мегакариоцитарных форм. Следовательно, некоторое увеличение объема тромбоцитов во 2 группе образцов имеет иную природу. Учитывая одновременное незначительное снижение PDW в 1 группе образцов, можно предположить, что одной из причин выявленных различий ($p=0,0149$) является разница в коллоидно-осмотическом балансе двух взятых в опыт взвешивающих сред (отсутствие коллоидных систем, присущих плазме крови человека, в суспендирующем растворе и дисбаланс разной степени электролитов и внутриклеточной воды во взвешенных в данных средах тромбоцитов). Для решения этой проблемы проследили изменение концентрации катионов кальция и магния во взвешивающих тромбоциты альтернативных средах на протяжении срока наблюдения (1-е — 5-е сутки, табл. 1).

Было установлено, что концентрация катионов кальция в период 1-е — 5-е сутки во взвешивающей среде 1 группы образцов имела тенденцию к повышению (на 5,17%, $p=0,1082$), в то время как во 2 группе образцов она достоверно возросла (на 20,44%, $p=0,0149$), то есть клетки теряли кальций в большей степени, чем

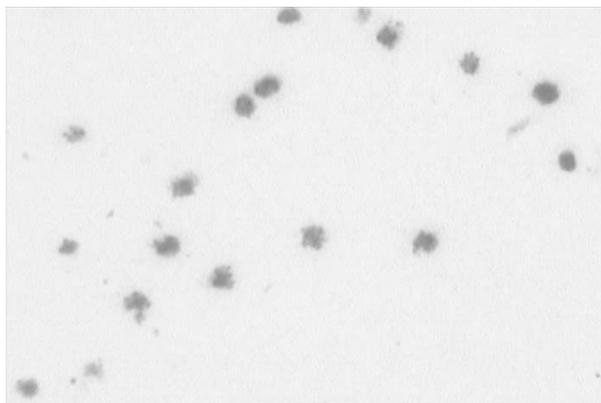


Рис. 3. Тромбоциты в аутологичной плазме.

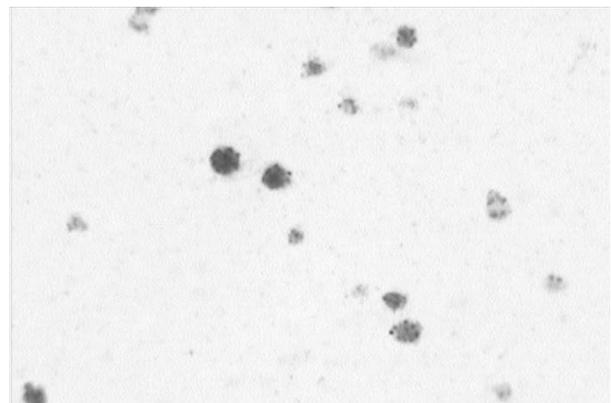


Рис. 4. Тромбоциты в суспендирующем растворе.

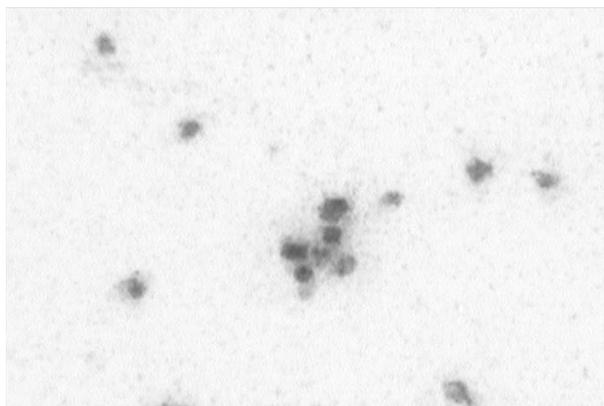


Рис. 5. Агрегат тромбоцитів в аутологічній плазмі.

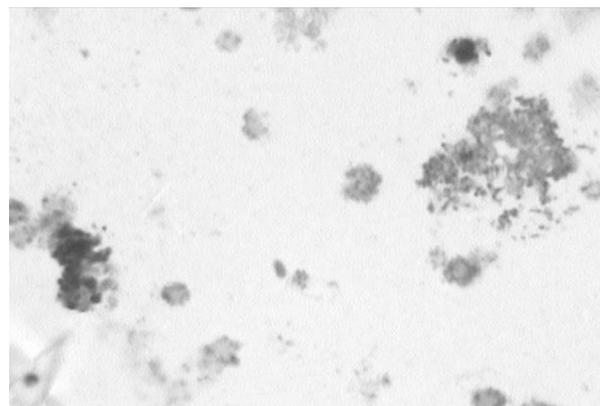


Рис. 6. Агрегати тромбоцитів в суспендируючому розстворі.

в 1 групі. Установили одночасне зниження концентрації катіонів магнія во взвешивающей среде обеих групп: достоверное — во 2 группе образцов (на 3,94%, $p=0,8261$) и незначительное в 1 группе образцов (на 1,25%, $p=0,8261$). Известно, что поскольку катион Mg^{2+} имеет меньший радиус, чем Ca^{2+} , он гидратируется лучше. Кроме того его свободные атомные орбитали внешнего уровня способны взаимодействовать с неподеленными парами электронов молекул воды, образуя достаточно устойчивые аквакомплексы $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$. Поэтому в гидратной оболочке катиона магния молекулы воды удерживаются значительно сильнее, чем в гидратной оболочке катиона кальция [5]. Следовательно, можно предположить, что катионы кальция, покидая клетку, уносили с собой меньшее количество молекул воды, чем привносили поступающие в клетку катионы магния, что могло вызвать увеличение объема тромбоцитов во 2 группе образцов в большей степени, чем в 1 группе образцов.

Известно, что показатель MPW может быть завышен при подсчете клеток с помощью автоматического гематологического анализатора в том случае, если во взвеси присутствуют агрегаты тромбоцитов, расценивающиеся анализатором как единая большая клетка [8]. Чтобы исключить или подтвердить данное утверждение, были сделаны мазки из образцов

взвеси тромбоцитов обеих групп. При рассмотрении снимков определили, что действительно во 2 группе образцов на 5-е сутки размер клеток визуально больше, чем в 1 группе образцов (рис. 3, 4).

Кроме того в образцах 2 группы агрегаты тромбоцитов встречаются чаще, сами агрегаты состоят из большего числа клеток (рис. 5, 6).

Выводы

Выбранные для сравнения взвешивающие среды для заготовки тромбоцитов человека (аутологичная плазма и суспендирующий раствор) в равной степени обеспечивают сохранность морфометрических показателей и электролитного гомеостаза в живой ткани — концентрате тромбоцитов — в течение первых двух суток хранения (период наибольшей востребованности данного компонента донорской крови).

При более длительном хранении взвеси тромбоцитов (5 суток) при температуре от $+18^{\circ}C$ до $+20^{\circ}C$ в пластиковых пробирках аутологичная среда взвешивания клеток, а именно собственная плазма крови донора, является более физиологичной, чем среда суспендирующего раствора, так как эффективнее сохраняет электролитный баланс и морфометрические характеристики тромбоцитов человека, а следовательно, и в искусственном окружении пластикового контейнера для хранения тромбоконцентрата.

Литература

1. Болезни крови у пожилых. Пер. с англ. / Под ред. М.Дж.Дэнхема, И.Чанарина. — М.: Медицина, 1989. — 352 с.
2. Вашкинел В.К., Петров М.Н. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. — Л.: Наука, 1982. — 88 с.
3. Гайдукова С.М., Видиборець С.В. Тромбоцитози в лікарській практиці // Мистецтво лікування. — 2004. — №10. — С. 16-18.
4. Медицинские лабораторные технологии: [Справочник] / Под ред. А.И.Карпищенко. — С.-Пб.: Интермедика, 1998. — Т. 1. — 407 с. Библиогр.: с. 309.
5. Мещлер Д. Биохимия: химические реакции в живой клетке. — М.: Мир, 1980. — Т. 1. — С. 267.
6. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови. Пер. с англ. — Милан: Европейская школа трансфузионной медицины, 2000. — 1055 с. Библиогр.: с. 604.

7. Чутрів А.М., Терещук Т.О. Контроль якості концентрату тромбоцитів, отриманого методом переривчастого аферезу // Гематологія і переливання крові. — 2006. — №33. — С. 148.
8. Яковец А. Автоматизований аналіз крові: методологічні нюанси // Медична газета «Здоров'я України». — 2008. — №7. — С. 69-70.
9. Trowbridge E.A., Warren C.W., Martin J.F. Platelet volume heterogeneity in acute thrombocytopenia // Clin. Phys. Physiol. Meas. — 1986. — №7. — P. 203-210.

П.М.Малиш, С.А.Кондрашев, В.Я.Гусакова, Н.Б.Щеголева. Тромбоцити людини: оцінка альтернативних зв'язаних середовищ для їх зберігання. Луганськ, Україна.

Ключові слова: тромбоцит, плазма, суспензуючий розчин.

Робота спрямована на пошук можливостей підвищення якості одного з найбільш затребуваних компонентів донорської крові — тромбоконцентрату — шляхом вибору адекватного середовища для збереження його нативних властивостей. Проведені дослідження показали, що аутологічне середовище тромбоцитів, а саме власна плазма крові донора, є більш фізіологічним, ніж середовище штучного розчину. Вона більш ефективно зберігає електролітний баланс і, відповідно, морфометричні характеристики тромбоцитів людини *in vitro* з використанням пластикового лабораторного посуду, а отже, і в штучному оточенні пластикового контейнера для зберігання тромбоконцентрату.

P.N.Malysh, S.A.Kondrashev, V.Ya.Gusakova, N.B.Shegoleva. Human platelets: an estimation of alternative suspension environments for their storage. Lugansk, Ukraine.

Key words: platelet, plasma, suspending solution.

The article is directed on search of possibility to improve the quality of one of the most requested components of donor blood — concentrate platelets — by a choice of the adequate environment for its native properties storage. The carried out researches have shown that autological environment for platelets — donor's blood plasma — is the most physiological, than environment of suspending solution, because more effectively keeps electrolyte balance and accordingly morphomeasuring characteristics of human platelets *in vitro* with use of plastic laboratory ware. Therefore in artificial environment of the plastic container for storage of platelets concentrate.

Надійшла до редакції 01.03.2010 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасва, 2010
УДК 615.387 + 612.111]: 616 — 085].001.5

Результати токсикологічного вивчення розчину для ресуспендування еритроцитної маси сахарофосфоксилу

Д.Л.Качмарик, Б.О.Кондрацький, О.П.Волос, М.Й.Винарчик,
О.М.Панас, Ю.В.Деркач, Н.Р.Корецька, В.Л.Новак

Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України
Львів, Україна

У роботі представлено результати дослідження розчину для ресуспендування еритроцитів сахарофосфоксилу на гостру токсичність. Показано, що сахарофосфоксил належать до групи практично нешкідливих речовин. Обґрунтовано разову терапевтичну дозу для застосування в клінічній практиці.

Ключові слова: ресуспендування еритроцитів, сахароза, сахарофосфоксил.

Вступ

Створення розчинів для ресуспендування еритроцитів донорської крові, які давали б

можливість більш тривалий час зберігати морфофункціональні властивості еритроцитної маси, залишається актуальним завданням ви-