

I.I.Lisnyy. Sleep correction in surgical patients in ICU. Kyiv, Ukraine.

Key words: sleep, sedation, melatonin.

It was shown that patients, which have got the combination of sibason and melatonin for sedation (Gr. S+M) the quality of sleep and the level of MMSE were more high and level of the urea in contrast with group Gr. S was lower, statistically differences were significant. The plasma level of melatonin in patients Gr. S+M was dramatically higher in contrast patients in Gr. S, $p=0,0288$ in 24:00 p.m. and $p=0,0052$ in 04:00 a.m. The administration of combination the exogenic melatonin and sibason for sedation and sleep correction in patients in ICU promotes the more high quality of sleep, without essential deepening level of sedation. The administration of exogenic melatonin in combination with sibason could promote the normalization circadian rhythm of sleep in ICU patients and decrease the rate of the side effects of sleep deprivation.

Надійшла до редакції 24.02.2011 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасва, 2011
УДК 591.111.01

Размножаются ли тромбоциты *in vitro*?

П.Н.Малыш, С.А.Кондрашев, Е.В.Фролова,
В.Я.Гусакова, Н.Б.Щеголева, В.Р.Саргсян, Л.П.Маснева

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»
(ректор — профессор В.К.Ивченко), КП «Луганская станция переливания крови —
областной центр службы крови» (главный врач — Е.В.Фролова),
Луганская диагностическая лаборатория (заведующий — д.м.н. П.К.Бойченко)
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.

Введение

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 [7, 15, 18, 19].

Кроме того, исследователи наблюдали процессы образования цепочек тромбоцитов в компонентах донорской крови, где клетки сохраняли способность к размножению в течение нескольких суток после заготовки [18]. Это открывает новые возможности для трансфузион-

ной 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 материала для построения новых клеток [6, 17, 19].

Целью исследования было определение возможности размножения тромбоцитов *in vitro* во взвеси, приготовленной с использованием аутологичной плазмы и суспендирующего раствора SSP+ без создания дополнительных условий для их культивирования, для чего изучили динамику количества и морфологии донорских тромбоцитов в период 5 сут. их хранения при

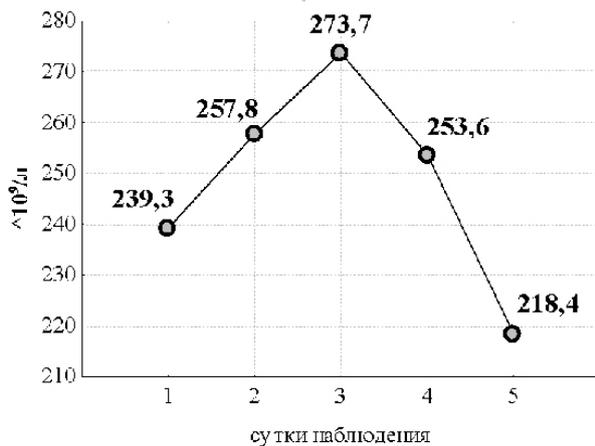


Рис. 1. Середнє число тромбоцитів, взвешених в аутоплазмі (1 група), на протязенні строка спостереження, *10⁹/л.

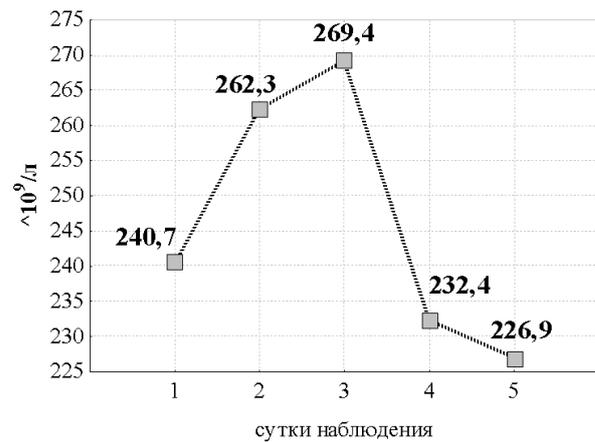


Рис. 2. Число тромбоцитів, взвешених в SSP+ (2 група), на протязенні строка спостереження.

температурном режимі $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Для рішення поставленої проблеми проведено сравнительний аналіз морфометричних показателів тромбоцитів.

Матеріали і методи дослідження

Исследовали взвесь тромбоцитів, выделенную из венозной крови группы 0(I) 26 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: 1 группа образцов — тромбоциты, взвешенные в 100% аутологичной плазме; 2 группа образцов — тромбоциты во взвешивающем растворе SSP+ с 20% аутологичной плазмой. Тестирование образцов, хранившихся при температуре $+20\pm 2^{\circ}\text{C}$, осуществлялось в течение 5 сут. с момента заготовки ежедневно.

Морфометрический контроль тромбоцитов в обеих группах образцов осуществлялся на основании показателей автоматических гематологических анализаторов Micros 60 OT (HORIBA ABX Diagnostics Inc., Франция) и HB-7021 (SINNOWA Medical Science & Technology Co., LTD, Китай), включающих параметры: среднее количество тромбоцитов (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV), относительная

ширина распределения тромбоцитов по объему (PDW).

Уровень холестерина в взвешивающей среде определяли при помощи автоматического биохимического анализатора Cobas Integra 400 plus (ROCHE Diagnostics Ltd., Швейцария).

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 [8]. Снимки были сделаны на 3 сут. 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). Условные обозначения статистических параметров в тексте и таблицах представили следующим образом: М — средняя арифметическая, m — ошибка репрезентативности (средняя ошибка для средних или относительных величин), r — коэффициент корреляции, p — доверительная вероятность.

Результаты исследования и их обсуждение

В момент заготовки среднее значение PLT составило $239,3\pm 29,33\cdot 10^9/\text{л}$ в 1 группе образцов и $240,7\pm 27,03\cdot 10^9/\text{л}$ во 2 группе образцов,

ОРИГІНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

что соответствует параметрам тромбоконцентрата, применяющегося для оказания трансфузиологического пособия больным, а именно от $200 \cdot 10^9$ до $800 \cdot 10^9$ тромбоцитов [12-13].

При исследовании образцов как 1-й, так и во 2 группы выявлена устойчивая тенденция к росту числа клеток в течение первых 3 сут. (рис. 1, 2).

Достигнув пика на 3 сут. (рост на 14,4%), показатель PLT в 1 группе образцов снижался: в 4 сут. — на 7,9% относительно наивысшего значения, и далее к 5 сут. — на 25,3%. Относительно момента заготовки к концу срока наблюдения снижение числа клеток составило 9,6%.

Очевидно, «старые» клетки, попавшие в образцы в момент их заготовки и образовавшиеся из «зрелых» в процессе хранения образцов, разрушались, что и обусловило снижение PLT на данном этапе наблюдения.

В образцах 2 группы повышение количества тромбоцитов было более значимым на 2 сут., чем в 1 группе (9,0% против 7,7%) и не столь значимым на 3 сут. (11,9% против 14,4%). Обратил на себя внимание тот факт, что на 4 сут. наблюдения количество тромбоцитов в образцах снижалось более резко, чем в 1 группе (15,9% против 7,9%). Следовательно, в суспендирующей среде образцов 2 группы условия менее адекватны для сохранения клеток. К концу срока наблюдения число клеток по сравнению с исходным снизилось на 6,8%.

Учитывая данные литературы, можно предположить, что повышение числа клеток в образцах может быть обусловлено:

а) трансформацией в тромбоциты гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), возможно, имеющихся в образцах в числе остаточных клеток донорской крови [1];

б) размножением тромбоцитов *in vitro*.

Известно, что ГСК циркулируют в кровеносном русле человека в количестве 1:100000 клеток крови [5]. В выделенном из донорской крови тромбоконцентрате имеет место остаточное количество лейкоцитов ($0,05-0,2 \cdot 10^9/\text{л}$) [4,

11] 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), приближаясь к размеру эритроцитов (7-8 мкм) [2, 9]. Однако можно предположить, что при дифференцированном 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) [3, 10]. Возможности использования данных стимулов для продукции дифференцированного, функционального потомства ГСК практически лишены во 2 группе образцов, так как сохранено лишь 20% аутоплазмы, в то время как микроокружение клеток в образцах 1 группы (100% аутоплазма) может содержать определенное количество указанных факторов. Однако результаты исследований показали процесс нарастания количества тромбоцитов, сходный в обеих группах. Следовательно, стволовые клетки не могут быть единственным источником новых тромбоцитов, появление которых в образцах очевидно.

Нами была принята рабочая гипотеза о размножении тромбоцитов *in vitro*. Она косвенно подтверждается тем, что средний объем исследуемых тромбоцитов на протяжении срока наблюдения имел тенденцию к увеличению, а к 4 сут. (во 2 группе образцов — к 3 сут.) возрос достоверно (табл. 1).

На всех этапах наблюдения статистически значимых различий в MPV между образцами 1 и 2 групп выявлено не было.

Выявленная динамика MPV требует объяснения. Известно, что наибольшими размерами обладают так называемые «тромбоциты раздражения», появляющиеся в популяции тромбоци-

Таблица 1

MPV во взвеси тромбоцитов

Сутки наблюдения	Взвешивающая среда, фл	
	Аутоплазма	SSP+
1	7,54±0,19	7,34±0,19
2	7,91±0,20	7,71±0,17
3	7,99±0,16	8,17±0,18*
4	8,17±0,16*	8,23±0,20*
5	8,30±0,19*	8,37±0,18*

Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с показателем 1 сут. наблюдения.

Таблица 2

Матрица корреляционной связи количества тромбоцитов и уровня холестерина во взвешивающей среде исследуемых образцов

Пара корреляционной связи	Взвешивающая среда			
	Аутоплазма		SSP+	
	г	р	г	р
Количество тромбоцитов — уровень холестерина	-0,99	<0,05	-0,99	<0,05

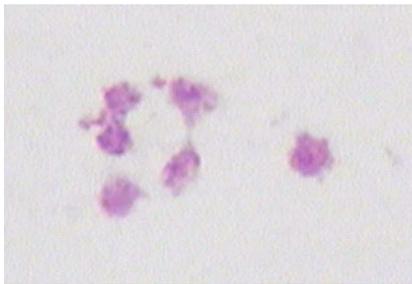


Рис. 3. Почкование тромбоцитов.



Рис. 4. Тромбоцит в виде палочки.



Рис. 5. Тромбоциты в цепочке из 3 клеток.



Рис. 6. Тромбоциты в цепочке из 4 клеток.



Рис. 7. Тромбоциты в цепочке из 5 клеток.



Рис. 8. Тромбоцит в связи с эритроцитом. Образец 1 группы.



Рис. 9. Тромбоцит в связи с эритроцитом. Образец 2 группы.

тов *in vivo* при тромбоцитопениях различного генеза [21]. Однако в условиях искусственной среды выделенных из донорской крови тромбоцитов *in vitro* отсутствует источник возникновения мегакариоцитарных форм. Следовательно, увеличение объема тромбоцитов имеет иную природу.

Популяция тромбоцитов, изначально помещенная в пробирку, на 92,5-97,4% [2] состоит из «зрелых» и «старых» клеток, подверженных процессу «platelet storage lesion» (повреждение во время хранения) [14, 16, 20]. Содержащихся в данной популяции «юных» клеток (до 0,8%) недостаточно для того, чтобы при их трансформации в «зрелые» к 5 сут. сохранилось значительное количество тромбоцитов и их объем, что имело место в нашем исследовании. Поэтому можно предположить, что «зрелые» клетки претерпевали возрастные изменения (следовательно, уменьшались в объеме) [2], а «старые»

разрушались по мере хранения образцов, а их нишу заполняли более крупные «потомки». В связи с изложенным было сделано предположение о том, что *in vitro* имело место именно размножение тромбоцитов.

Общеизвестно, что появление новой клетки предусматривает «строительство» ее составляющих. Для того чтобы подтвердить или отрицать расходование из окружающей тромбоциты среды «строительного материала» для новых клеток, нами был выбран показатель уровня холестерина как обязательной составляющей мембраны тромбоцита. Изучили динамику показателя уровня холестерина во взвешивающей среде на этапах наблюдения.

Установили, что в первые 3 сут. в обеих группах образцов уровень холестерина имел тенденцию к снижению, после чего нарастал к 5 дню. Выявлена корреляционная связь между количеством тромбоцитов в исследуемых образцах и уровнем холестерина во взвешивающей среде, что подтверждает расходование последнего на построение новых клеток в первые 3 сут. наблюдения и увеличение его содержания по мере «platelet storage lesion» (табл. 2).

Дисперсия распределения тромбоцитов по объему (PDW) в каждый день наблюдения в обеих группах образцов оставалась неизменной (колебания от 11,0% до 11,4% в 1 группе образцов и от 10,6% до 10,9% во 2 группе образцов, не имеющие статистической значимости). Это также свидетельствует в пользу появления в по-

пуляции тромбоцитов новых клеток, позволяющих сохранить баланс «старые»/«юные» клетки на первоначальном уровне, так как при хранении тромбовзвеси *in vitro* неизбежны «старение» и гибель «стареющих» и «старых» клеток.

Предположение о размножении тромбоцитов *in vitro* потребовало подтверждения при помощи микроскопии. В образцах обеих групп нами были выявлены признаки этого процесса, описанные в литературе, — почкование тромбоцитов (рис. 3); тромбоциты в виде палочек, имеющих в центре оптическое уплотнение (рис. 4), впоследствии размножающихся поперечным делением; образование цепочек, состоящих из 3-5 клеток (рис. 5-7). Нам также удалось зафиксировать на снимках связь тромбоцитов с эритроцитами (рис. 8, 9), охарактеризованную М.В.Лифановским и В.А.Ульман как «паразитирование» тромбоцитов с использованием кислого рода гемогрупп, аминокислот эритроцитов [7].

Почему же нет статистической достоверности увеличения PLT вследствие размножения тромбоцитов в опытных образцах? Не исключено, что оно маскируется естественной гибелью «старых» клеток в процессе хранения образцов и ускоренным «старением» с последующей гибелью «зрелых» тромбоцитов по причине условий искусственного окружения, не содержащего достаточного количества веществ, обеспечивающих адекватное поддержание морфофункциональных свойств тромбоцитов.

Литература

1. Бенедь О.О. Стволові клітини, їх використання в практичній медицині. — Режим доступу: http://www.transplantology.com/index.php?option=com_content&task=view&id=388&Itemid=42
2. Гайдукова С.М., Видиборець С.В. Тромбоцитози в лікарській практиці // Мистецтво лікування. — 2004. — №10. — С. 16-18.
3. Гривенников И.А. Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки // Успехи биологической химии. — 2008. — Т.48. — С. 181-220.
4. Жибурт Е.Б., Коденев А.Т., Вашенко Г.А., Капустов В.И. Совершенствование получения концентрата тромбоцитов // Вестник службы крови России. — 2010. — №2. — С. 22-25.
5. Космачева 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.
6. Лифановский В.А. Способ получения тромбоцитов / Патент Р.Ф. №2068265, 1992 г. — <http://www.hemostas.ru/society/publications/p9.shtml>
7. Лифановский М.В., Ульман В.А. Размножение тромбоцитов? — Калининград: Калинингр. кн. изд-во, 1994. — 71 с.
8. Медицинские лабораторные технологии: [Справочник] / Под ред. А.И.Карпищенко. — Санкт-Петербург: Интермедика, 1998. — Т.1. — 407 с.
9. 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)
10. Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е. Современные представления о биологии стволовых клеток костного мозга и крови в аспекте их клинического применения // Вестн. трансплантол. и искусствен. органов. — 2004. — №3. — С. 54-62.
11. Порядок контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові, її компонентів: Метод. рек., затверджені Наказом Міністерства охорони здоров'я України від 9 березня 2010 р. №211. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 8 червня 2010 р. за №368/17663.

Итак, исследования показали вероятность размножения тромбоцитов *in vitro*. Однако для того, чтобы полностью доказать это предположение, необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение возможных причин увеличения объема тромбоцитов в процессе хранения за счет изменения водно-электролитного баланса, а также за счет образования агрегатов, расцениваемых автоматическим гематологическим анализатором как единая большая клетка (изучить с помощью агрегометра).

Выводы

Выбранные для сравнения взвешивающие среды для заготовки тромбоцитов человека (аутологичная плазма и ресуспендирующий раствор SSP+) в равной степени обеспечивают не только сохранность морфометрических показателей тромбоцитов в течение 5 сут. хранения, но и увеличение числа клеток в первые 3 сут.

Не исключено, что тромбоциты сохраняют возможность размножаться *in vitro* даже при условии их хранения в суспендирующем растворе, содержащем лишь неорганические вещества.

При условии доказанности появления новых клеток в их взвеси *in vitro* следует рассмотреть варианты моделирования суспендирующей тромбоконцентрат среды путем добавления компонентов, способных обеспечить благоприятные условия для размножения тромбоцитов.

12. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови. Пер. с англ. — Милан: Европейская школа трансфузионной медицины. — 2000. — 1055 с.
13. Чугрієв А.М., Терещук Т.О. Контроль якості концентрату тромбоцитів, отриманого методом переривчастого аферезу / Гемостаз — проблеми та перспективи: Матеріали II Міжнародного симпозиуму (8-9 листопада 2006 р.). — 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
14. Devine D.V., Serrano K. The Platelet Storage Lesion // Clin. Lab. Med. — 2010. — Vol. 30. — №2. — P. 475-487.
15. Helbig W. Effect of polyenyl phosphatidylcholines on thrombocyte adhesiveness and thrombocyte propagation in vitro // Z. Gesamte Inn. Med. — 1974. — №29 (11). — P. 456-459.
16. Kaufman R.M. Platelets: Testing, Dosing and the Storage Lesion-Recent Advances // Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2006. — P. 492-496.
17. Moake J. Platelets in bloom // Blood. — 2010. — Vol. 115, Issue 18. — P. 3650-3651.
18. Schwertz H., Blaylock R.C., Kraiss L.W. et al. Terminally-differentiated anucleate platelet progeny <http://www.sumobrain.com/patents/wipo/Terminally-differentiated-anucleate-platelet-progeny/WO2010042179A1.pdf>
19. Schwertz H., Köster S., Kahr W.H.A. et al. Anucleate platelets generate progeny // Blood. — 2010. — №115. — P. 3801-3809.
20. Thon J.N., Devine D.V. Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets // Transfusion. — 2007. — №47 (12). — P. 2260-2270.
21. 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.О.Кондрашев, О.В.Фролова, В.Я.Гусакова, Н.Б.Щоголева, В.Р.Саргсян, Л.П.Маснева. Чи розмножуються тромбоцити 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 офіційного додаткового розчину для зберігання тромбоцитів.

P.N.Malysh, S.A.Kondrashev, E.V.Frolova, V.Ya.Gusakova, N.B.Zshogoleva, V.R.Sargsyan, L.P.Masneva. Whether will platelets reproduce in vitro? Lugansk, Ukraine.

Key words: reproduction, platelet, morphometric indices.

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.

Надійшла до редакції 12.03.2011 р.

© Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можасєва, 2011
УДК 618.3: 616.8 — 009.24 — 08

Интенсивное лечение эклампсической комы

В.В.Мороз, Ю.С.Подольский

НИИ общей реаниматологии им. В.А.Неговского РАМН
(директор — член-корр. РАМН профессор В.В.Мороз)
Москва, Россия

Целью исследования было повышение эффективности лечения родильниц в эклампсической коме путем обоснования, разработки и внедрения новых алгоритмов коррекции системных гемодинамических, метаболических нарушений и перфузионно-метаболических изменений в тканях головного мозга. Исследования проведены у 18 родильниц в эклампсической коме (2 группа), у которых использован новый алгоритм лечения, направленный на поддержание исходного церебрального перфузионного давления, восстановление волевых показателей за счет интерстициальной жидкости. В контрольной группе (1 группа) было 30 больных, которым проводили общепринятое стандартное лечение. Измерение регионарного мозгового кровотока производили неинвазивным (ингаляционным) радиоизотопным