

ИЗМЕРЕНИЕ ТРОМБОЦИТАРНЫХ МИКРОЧАСТИЦ В КОНТЕКСТЕ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ КОНЦЕНТРАТОВ ТРОМБОЦИТОВ

Ласточкина Д.В., Касьянов А.Д., Гришина Г.В., Голованова И.С.,

Смирнова О.А., Матвиенко О.Ю., Бессмельцев С.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Российский научно-исследовательский институт гематологии и
трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»,

Санкт-Петербург

Россия, 191024, Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, 16,

тел. (812) 309-79-81,

Резюме

Введение. Трансфузионная терапия с использованием концентратов тромбоцитов (КТ) является важной клинической опцией в лечении пациентов гематологического, гинекологического, хирургического и онкологического профиля. В связи с возросшей потребностью применения данного компонента крови оценке его качества и безопасности уделяется повышенное внимание.

Цель исследования. Анализ количественных изменений клеточного состава и тромбоцитарных микрочастиц в аферезном концентрате тромбоцитов на сроках хранения.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись аферезные концентраты тромбоцитов, заготовленные на плазме и добавочном растворе SSP+. Количество тромбоцитов на сроках хранения определяли с помощью гематологического анализатора Medonic M20 (Швеция). Количество тромбоцитарных микрочастиц регистрировали на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) путем бокового рассеяния излучения фиолетового лазера.

Результаты. Выявлено, что количество тромбоцитов существенно не меняется в процессе хранения, тогда как уровень микрочастиц значительно увеличивался как в концентратах тромбоцитов, заготовленных на плазме, так и в концентратах тромбоцитов в добавочном растворе.

Заключение. Возможность дифференцировки концентратов тромбоцитов по уровню активации будет способствовать безопасности проводимой трансфузионной терапии и рациональному использованию востребованного компонента крови.

Ключевые слова: концентрат тромбоцитов; микрочастицы; проточная цитометрия; светорассеяние; рефрактерность

PLATELET MICROPARTICLE MEASUREMENT IN THE CONTEXT OF SAFETY ASSESSMENT OF PLATELET CONCENTRATES

Lastochkina D.V., Kasyanov A.D., Grishina G.V., Golovanova I.S.,

Smirnova O.A., Matvienko O.Y., Bessmeltsev S.S.

Russian research institute of hematology and transfusiology

St. Petersburg, Russia

Summary

Introduction. Transfusion therapy using platelet concentrates is an important clinical option in the treatment of hematologic, gynecologic, surgical and oncologic patients. Due to the increased need for the use of this blood component, the assessment of its quality and safety is given increased attention.

The aim of the work. To analyze quantitative changes in cellular composition and platelet microparticles in apheresis concentrate of platelets on storage time.

Materials and Methods. The object of the study was apheresis concentrates of platelets prepared on plasma and SSP+ supplement solution. The number of platelets on storage terms was determined using hematological analyzer Medonic M20 (Sweden). The number of platelet microparticles was recorded on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, USA) by side scattering of violet laser radiation.

Results. It was revealed that the number of platelets did not significantly change during storage, whereas the level of microparticles significantly increased both in platelet concentrates prepared on plasma and in platelet concentrates in supplement solution.

Conclusion. The possibility of differentiation of platelet concentrates by the

level of activation will contribute to the safety of the conducted transfusion therapy and rational use of the demanded blood component.

Keywords: platelet concentrate; microparticles; flow cytometry; light scattering; refractoriness

Введение

Трансфузионная терапия с использованием концентратов тромбоцитов (КТ) является важной клинической опцией в лечении пациентов гематологического, гинекологического, хирургического и онкологического профиля. В связи с возросшей потребностью применения данного компонента крови оценке его качества и безопасности уделяется повышенное внимание. Регламентированный контроль качества предполагает оценку количества тромбоцитов, измерение рН, остаточных лейкоцитов. Однако в отношении функциональной составляющей тромбоцитов не предусмотрено проведение каких-либо тестов *in vitro*.

В клинической практике в качестве оценки эффективности трансфузии КТ используются ряд параметров, оцениваемых у пациента после трансфузии. В то же время до 30% всех трансфузий КТ оказываются неэффективными, что определяется по 24-часовому скорректированному приросту тромбоцитов менее $5 \times 10^9/\text{л}$, что не приводит к желаемому клиническому результату [1]. На клиническую эффективность трансфузии могут оказывать влияние многочисленные факторы, связанные как с характеристиками донора, так и с особенностями заготовки, дополнительной обработки и хранения полученного КТ [2]. К примеру, у 33% здоровых доноров выявлены изначально активированные тромбоциты, на что указывает высокий уровень микрочастиц (МЧ) [3].

В целом микрочастицы, представляют собой небольшие пузырьки мембранного происхождения, содержащиеся в жидкостях организма, которые участвуют в межклеточной коммуникации и помогают регулировать широкий спектр биологических процессов [4].

Микрочастицы во многом определяют активацию тромбоцитов [5]. Еще в 70-е годы XX века было показано, что более жизнеспособные тромбоциты обладают меньшими функциональными свойствами, обеспечивающими гемостатическую функцию, то есть являются менее активными. Такие тромбоциты более однородны по своему составу и содержат лишь небольшое количество микрочастиц [2]. Более того эксперимент 50-летней давности продемонстрировал зависимость между температурным хранением тромбоцитов и их жизнеспособностью, а соответственно, и активностью. Тромбоциты, хранящиеся при комнатной температуре, были более жизнеспособными, тогда как хранение в условиях гипотермии выявило изменение функциональных свойств, проявляющееся в повышенной гемостатической активности [6, 7].

Пациенты гематологического и онкологического профиля имеют показания к трансфузии тромбоцитов в связи с риском развития геморрагического синдрома ввиду тромбоцитопении на фоне основного заболевания или проводимой противоопухолевой терапии и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Другими показаниями к переливанию КТ являются массивные кровопотери в результате травм, хирургических вмешательств. Как уже ранее было указано, активированные тромбоциты имеют ограниченную жизнеспособность и не будут оказывать необходимого эффекта для онкологических пациентов [8]. Напротив, для хирургических или травматологических пациентов трансфузии КТ, содержащих предварительно активированные тромбоциты будут иметь хорошую эффективность ввиду реализации высокой гемостатической активности для остановки массивного кровотечения [9].

Большинство имеющихся тестов для определения МЧ трудоемки и поэтому не могут проводиться в рутинном порядке в больничных банках крови [10-12]. Наиболее широко используемым методом для исследования МЧ является проточная цитометрия. Однако применение данного метода носит ряд ограничений ввиду небольшого размера тромбоцитарных МЧ в связи с ограниченным диапазоном их обнаружения для большинства проточных

цитометров, вызванным конструктивными особенностями прибора, определяемыми производителем [13].

Лазерный проточный цитофлуориметр CytoFLEX (Beckman Coulter, США) является передовым исследовательским инструментом, в котором конфигурация блока детекции может быть изменена для регистрации бокового рассеяния излучения фиолетового лазера (405 нм). Этот канал (VSSC) можно использовать для детекции МЧ размерами менее 200 нм с высоким разрешением.

В настоящее время существует альтернативный проточной цитометрии метод измерения содержания микрочастиц в КТ, заключающийся в применении техники динамического рассеивания света. Методика выполняется путем освещения взвешенных частиц лазерным светом и анализа изменения интенсивности рассеянного света во времени, которое является следствием движения частиц во взвешенном состоянии. Кроме того, данный метод использует обратную зависимость между скоростью и размером частиц с целью получения информации о распределении размеров и относительных концентрациях микрочастиц в исследуемой пробе. Таким образом, метод на основе светорассеивания может определить количественное содержание и радиус микрочастиц [14].

Цель работы.

Анализ количественных изменений клеточного состава и тромбоцитарных микрочастиц в аферезном концентрате тромбоцитов на разных сроках хранения.

Материалы и методы

Проведено исследование 20 образцов аферезных концентратов тромбоцитов лейкоредуцированных, при этом 14 образцов были заготовлены на плазме, а 6 – в добавочном растворе SSP⁺. Контрольные измерения проводились в день заготовки и на 5 сутки хранения при стандартных условиях (постоянное помешивание при температуре +22 °С). В качестве исследуемых показателей оценивалось количество тромбоцитов и тромбоцитарных микрочастиц.

Для определения количества тромбоцитов использовали автоматический гематологический анализатор Medonic M20 (Швеция).

Содержание тромбоцитарных микрочастиц определяли методом проточной цитофлуориметрии. Исследование включало следующие этапы:

- получение суспензии микрочастиц;
- пробоподготовка;
- анализ на проточном цитофлуориметре и оценка результатов.

Получение суспензии МЧ осуществлялось путем двухэтапного центрифугирования КТ и ресуспендирования осадка в аннексиновом буфере.

Идентификация микрочастиц производилась с применением моноклональных антител Anti-Hu CD41 – APC (Clone MEM-06) к поверхностным маркерам тромбоцитов.

Анализ образцов проводился на проточном цитофлуориметре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) путем бокового рассеяния излучения фиолетового лазера. Разработанный протокол предусматривает набор 1000000 событий для каждого образца. Образцы необходимо проанализировать в течение 30 мин после окрашивания.

Результаты исследования представлены в виде медианы (Me), первого и третьего квартиля (Q1 – Q3). Для оценки различий между двумя зависимыми группами использовали критерий Вилкоксона. Статистически значимые различия определялись при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все исследуемые концентраты тромбоцитов были заготовлены методом автоматического афереза согласно установленным требованиям. Результаты измерений количества тромбоцитов и уровня тромбоцитарных МЧ в день заготовки и на 5 сутки хранения представлены в таблице 1.

Таблица 1

Значения количества тромбоцитов и микрочастиц в концентратах
тромбоцитов

Параметр		1 сутки	5 сутки
КТ в плазме	Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	940 (856 – 1068)	1020 (892 – 1088)
	Микрочастицы, абс.	5688 (4716 – 8459)	36743 (30366 – 40325)
КТ в добавочном растворе	Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	915 (783 – 992)	1011 (811 – 1183)
	Микрочастицы, абс.	12839 (8660 – 15642)	70760 (53706 – 93247)

Количество тромбоцитов в КТ заготовленных на плазме в день заготовки и на 5 сутки хранения значимо не отличалось и составило $940 \times 10^9/\text{л}$ против $1020 \times 10^9/\text{л}$, $p > 0,05$ (рисунок 1). Незначительное нарастание количества тромбоцитов к 5 суткам хранения (+8%) может являться следствием образования микроагрегатов в день заготовки КТ. В свою очередь количество тромбоцитарных МЧ в процессе хранения КТ значимо возрастало и к 5 суткам составило 36743 по сравнению с 5688 в день заготовки ($p = 0,0001$, +546%), что может свидетельствовать о выраженной активации тромбоцитов.

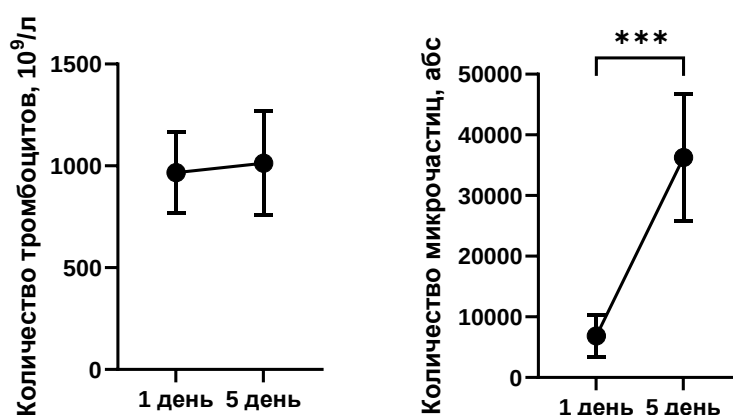


Рисунок 1. Динамика изменений показателей КТ, заготовленных на
плазме

Примечание: *** - $p < 0,001$

Уровень тромбоцитов в КТ заготовленных в добавочном растворе аналогичным образом существенно не отличался на 1 и 5 сутки, составив $915 \times 10^9/\text{л}$ и $1011 \times 10^9/\text{л}$ (+10%) соответственно, $p > 0,05$ (рисунок 2). Вместе с тем количество тромбоцитарных МЧ увеличивалось на 5 сутки хранения с 12839 до 70760 ($p=0,03$). Таким образом, начальная степень активации тромбоцитов значимо увеличивалась к концу срока хранения.

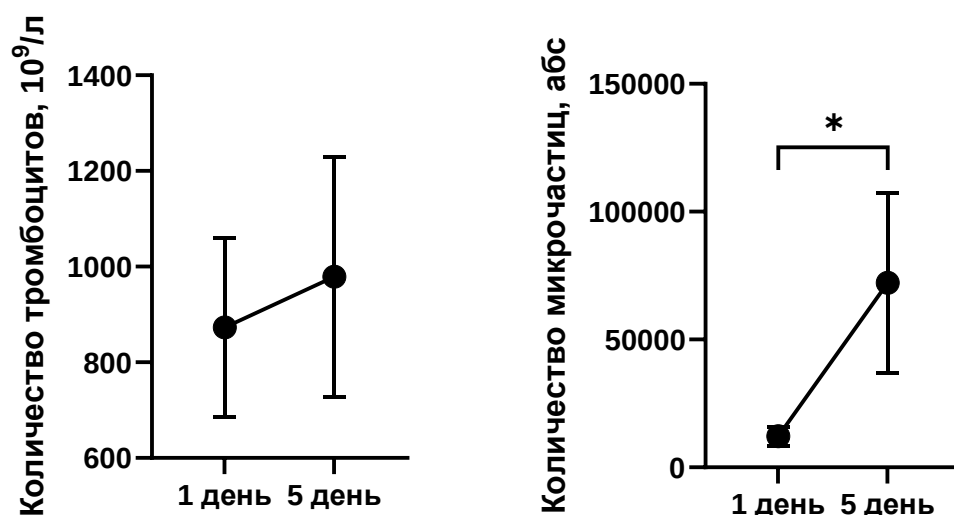


Рисунок 2. Динамика изменений показателей КТ, заготовленных в добавочном растворе

Примечание: * - $p < 0,05$

Важно отметить, что уровень микрочастиц в КТ заготовленных на плазме был ниже в сравнении с КТ заготовленных в добавочном растворе и составил 5688 (4716 – 8459) против 12839 (8660 – 15642), $p = 0,006$. Данное явление может свидетельствовать о влиянии вида заготовки на степень активации тромбоцитов.

Заключение

Управление запасами тромбоцитов, основанное на анализе содержания тромбоцитов и тромбоцитарных микрочастиц в концентратах тромбоцитов, является перспективной стратегией в области повышения эффективности и безопасности трансфузионной терапии [14]. С помощью обнаружения микрочастиц на основе метода светорассеяния можно дифференцировать активированные компоненты (с высоким содержанием микрочастиц) и не активированные (с низким содержанием микрочастиц) при переливании, тем

самым оптимизировать использование высоко востребованного компонента крови – аферезного концентрата тромбоцитов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования

Исследование не имело спонсорской поддержки

Вклад авторов

Концепция и дизайн: все авторы.

Сбор и обработка данных: все авторы

Анализ и интерпретация данных: все авторы.

Подготовка рукописи: Ласточкина Д.В., Касьянов А.Д., Матвиенко О.Ю.

Окончательное одобрение рукописи: Касьянов А.Д., Бессмельцев С.С.

Список литературы

1. Sigle J.P., Medinger M., Stern M., Infanti L., Heim D., Halter J. et al. Prospective change control analysis of transfer of platelet concentrate production from a specialized stem cell transplantation unit to a blood transfusion center. *Journal of Clinical Apheresis*. 2012; 27: 178 – 182.
2. Labrie A., Marshall A., Bedi H., Maurer-Spurej E. Characterization of platelet concentrates using dynamic light scattering. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013; 40(2): 93 – 100.
3. Maurer-Spurej E., Larsen R., Labrie A., Heaton A., Chipperfield K. Microparticle content of platelet concentrates is predicted by donor microparticles and is altered by production methods and stress. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; 55(1): 35–43.
4. Andaloussi E.L. S., Mager I., Breakefield X.O., Wood M.J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013; 12(5): 347 – 357.

5. Viera A.J., Mooberry M., Key N.S. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and out- comes. *Journal of the American Society of Hypertension* 2012; 6: 243 – 252.
6. Valeri C. R. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4 C or 22 C: studies in aspirin-treated normal Volunteers. *Transfusion*. 1976; 16(1): 20 – 23.
7. Becker G. A., Tuccelli M., Kunicki T., Chalos M. K., Aster R. H. Studies of platelet concentrates stored at 22 C and 4 C. *Transfusion*. 1973; 13(2): 61 – 68.
8. Schiffer C.A., Anderson K. C., Bennett C. L. Bernstein S., Elting L.S., Goldsmith M. et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19(5): 1519 – 1538.
9. Getz T.M., Montgomery R.K., Bynum J.A., Aden J.K., Pidcoke H.F., Cap A.P. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016; 56(6): 1320 – 1328.
10. Obeid S, Ceroi A., Mourey G., Saas P., Elie-Caille C., Boireau W. Development of a NanoBioAnalytical platform for "on-chip" qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 93: 250 – 259.
11. Anderson W., Kozak D., Coleman V.A., Jaemting A.K., Trau M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013; 405: 322 – 330.
12. Gyöergy B, Szabo T.G., Turiak L., Wright M., Herczeg P., Ledeczki Z. et al. et al. Improved Flow Cytometric Assessment Reveals Distinct Microvesicle (Cell-Derived Microparticle) Signatures in Joint Diseases. *PLOS One*. 2012; 7(11): 49726.
13. Inglis H., Norris P., Danesh A. Techniques for the analysis of extracellular vesicles using flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; 17(97): 52484.

14. Millar D., Murphy L., Labrie A., Maurer-Spurej E. Routine Screening Method for Microparticles in Platelet Transfusions. *Journal of Visualized Experiments*. 2018; 31(131): 56893.

References:

1. Sigle J.P., Medinger M., Stern M., Infanti L., Heim D., Halter J. et al. Prospective change control analysis of transfer of platelet concentrate production from a specialized stem cell transplantation unit to a blood transfusion center. *Journal of Clinical Apheresis*. 2012; 27: 178 – 182.

2. Labrie A., Marshall A., Bedi H., Maurer-Spurej E. Characterization of platelet concentrates using dynamic light scattering. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013; 40(2): 93 – 100.

3. Maurer-Spurej E., Larsen R., Labrie A., Heaton A., Chipperfield K. Microparticle content of platelet concentrates is predicted by donor microparticles and is altered by production methods and stress. *Transfusion and Apheresis Science*. 2016; 55(1): 35–43.

4. Andaloussi E.L. S., Mager I., Breakefield X.O., Wood M.J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2013; 12(5): 347 – 357.

5. Viera A.J., Mooberry M., Key N.S. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and out- comes. *Journal of the American Society of Hypertension* 2012; 6: 243 – 252.

6. Valeri C. R. Circulation and hemostatic effectiveness of platelets stored at 4 C or 22 C: studies in aspirin-treated normal Volunteers. *Transfusion*. 1976; 16(1): 20 – 23.

7. Becker G. A., Tuccelli M., Kunicki T., Chalos M. K., Aster R. H. Studies of platelet concentrates stored at 22 C and 4 C. *Transfusion*. 1973; 13(2): 61 – 68.

8. Schiffer C.A., Anderson K. C., Bennett C. L. Bernstein S., Elting L.S., Goldsmith M. et al. Platelet transfusion for patients with cancer: clinical practice

guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 2001; 19(5): 1519 – 1538.

9. Getz T.M., Montgomery R.K., Bynum J.A., Aden J.K., Pidcoke H.F., Cap A.P. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016; 56(6): 1320 – 1328.

10. Obeid S, Ceroi A., Mourey G., Saas P., Elie-Caille C., Boireau W. Development of a NanoBioAnalytical platform for "on-chip" qualification and quantification of platelet-derived microparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017; 93: 250 – 259.

11. Anderson W., Kozak D., Coleman V.A., Jaemting A.K., Trau M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2013; 405: 322 – 330.

12. Gyöergy B, Szabo T.G., Turiak L., Wright M., Herczeg P., Ledeczki Z. et al. et al. Improved Flow Cytometric Assessment Reveals Distinct Microvesicle (Cell-Derived Microparticle) Signatures in Joint Diseases. *PLOS One*. 2012; 7(11): 49726.

13. Inglis H., Norris P., Danesh A. Techniques for the analysis of extracellular vesicles using flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments*. 2015; 17(97): 52484.

14. Millar D., Murphy L., Labrie A., Maurer-Spurej E. Routine Screening Method for Microparticles in Platelet Transfusions. *Journal of Visualized Experiments*. 2018; 31(131): 56893.