

ИЗУЧЕНИЕ СТАТУСА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ПРИ ЗАГОТОВКЕ АППАРАТУРЫ

Касьянов А.Д.¹, Гришина Г.В.¹, Голованова И.С.¹, Ким Е.В.¹, Ласточкина Д.В.¹,
Смирнова О.А.¹, Матвиенко О.Ю.¹, Бессмельцев С.С.^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства»

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

191015, Россия, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

Резюме. Образование микрочастиц (микровезикул) является неотъемлемым проявлением жизнедеятельности клеток и происходит как «in vivo», так и «in vitro». Среди всех микрочастиц, находящихся в крови, микрочастицы тромбоцитов (ТМЧ) являются наиболее многочисленными. ТМЧ могут представлять патофизиологическую угрозу или пользу для клеточной среды при взаимодействии с кровеносной системой. Также появляется все больше доказательств того, что выработка ТМЧ запускается во время донации, разделения на компоненты и хранения крови.

Цель исследования. Изучение статуса активации концентратов тромбоцитов в зависимости от используемой при заготовке аппаратуры.

Материалы и методы. Исследован статус активации по тромбоцитарным микрочастицам 56 аферезных концентратов тромбоцитов, заготовленных с использованием аппаратов для цитафереза Trima Accel (Terumo BCT, США) и MCS+ (Haemonetics Corporation, США) на сроках хранения.

Результаты. Данные исследования свидетельствуют о значимом увеличении содержания тромбоцитарных микрочастиц к концу срока хранения, более выраженном при использовании сепаратора Trima Accel.

Заключение. Оценка статуса активации тромбоцитов по уровню содержания микрочастиц позволит улучшить качество и эффективность проводимой трансфузионной терапии.

Ключевые слова: тромбоцитный концентрат, микрочастица, цитаферез, проточная цитометрия, цитофлуориметр

STUDY OF PLATELET ACTIVATION STATUS DEPENDING ON THE APPARATUS USED IN HARVESTING

Kasyanov A.D.¹, Grishina G.V.¹, Golovanova I.S.¹, Kim E.V.¹, Lastochkina D.V.¹,
Smirnova O.A.¹, Matvienko O.Y.¹, Bessmeltsev S.S.^{1,2}

¹*Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, St. Petersburg, Russia*

²*Federal State Budgetary Institution of Higher Education "North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov" of the Ministry of Health of the Russian Federation*

Summary

Introduction. The formation of microparticles (MPs) (microvesicles) is an inherent manifestation of cellular activity and occurs both “in vivo” and “in vitro”. Among all microparticles found in blood, platelet microparticles (PMPs) are the most abundant. PMPs may pose a pathophysiologic threat or benefit to the cellular environment when interacting with the circulatory system. There is also growing evidence that production of PMPs is triggered by the time of donation, separation into components, and storage of blood.

The aim of the work. To investigate the activation status of platelet concentrates depending on the instrumentation used during procurement.

Materials and Methods. The activation status by platelet microparticles of 56 apheresis platelet concentrates prepared using Trima Accel (“Terumo VST”, USA) and MCS+ (Haemonetics Corporation, USA) cytapheresis machines for storage time was investigated.

Results and discussion. The data of the study indicate a significant increase in platelet microparticle content by the end of the storage period, more pronounced when using the Trima Accel separator.

Conclusion. Assessment of platelet concentrate activation status by the level of microparticles content will improve the quality and efficiency of transfusion therapy.

Keywords: platelet concentrate, microparticle, cytapheresis, flow cytometry, cytofluorimeter.

Введение

Концентрат тромбоцитов (КТ) является одним из самых востребованных компонентов донорской крови. Особенно остро нуждаются в трансфузиях КТ пациенты с онкогематологическими заболеваниями. Однако от 10 % до 30 % всех переливаний тромбоцитов клинически неэффективны, что подтверждается низким ($< 5\%$) показателем скорректированного прироста количества тромбоцитов (СПТ₂₄).

Донорская кровь и ее компоненты могут содержать клеточные фрагменты из различных клеток, в первую очередь из активированных тромбоцитов. Выполняя роль врожденных иммунных клеток и основных участников процесса свертывания крови, тромбоциты меняют форму и генерируют микрочастицы (ТМЧ).

Микрочастицы (МЧ) являются важным фактором в трансфузионной терапии [1-3]. Эти небольшие везикулы, содержащиеся в плазме крови играют сложную и динамичную физиологическую роль в качестве посредников далеко идущих межклеточных коммуникаций путем экспрессии различных мембранно-ассоциированных белков и переноса рецепторов, факторов роста и микроРНК [1-4]. Микрочастицы могут быть маркерами воспаления [4] и гиперкоагуляции [3].

Семьдесят-девяносто процентов микрочастиц происходят из тромбоцитов [5,6]. Тромбоциты, помимо реакции на агонисты, генерируют микрочастицы в ответ на активацию комплемента, сдвиговые усилия, старение и цитоскелетные аномалии [2]. Повышение концентрации или измененные характеристики микрочастиц плазмы крови *in vivo* ассоциируются с гипертонией [7], сердечно-сосудистыми заболеваниями [8], повторными выкидышами [9], острым повреждением легких, связанным с переливанием крови [10], бактериальным эндотоксином [11], гиперкоагуляцией при диабете 2 типа [12], болезнью Крона [13], сепсисом [14,15] и аутоиммунными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, псориаз и бронхиальная астма [16-18], а также меланомой [19]. Кроме того, пропорциональное увеличение содержания ТМЧ по отношению к концентрации тромбоцитов в процессе хранения концентрата тромбоцитов может быть обусловлено различными методами сепарации или особенностями методов дополнительной обработки [20]. Концентрация ТМЧ прямопропорционально определяет статус активации тромбоцитов в КТ – высокий уровень ТМЧ говорит о наличии активированных тромбоцитов, тогда как низкий уровень – о неактивированных.

Проточная цитометрия (ПЦ), наиболее часто используемая процедура исследования МЧ, в том числе ТМЧ, выявляет поверхностные антигены, специфичные к клеточному происхождению. Аннексин-V может быть использован в качестве общего маркера для МЧ; интегрин- $\alpha 2b$ (CD41), CD-61, CD42b или Р-селектин (СР-62Р) для ТМЧ; CD45 для лейкоцитарных МЧ; и VE-кадгерин (CD144), V-CAM 1 и E-селектин (CD62E) для МЧ эндотелиальных клеток [21]. Преимуществом метода является возможность одновременного обнаружения двух и более антигенов на МЧ антителами, конъюгированными с разными хромофорами [22]. ПЦ требует тщательной преаналитической подготовки образца, точного определения гейтов и калибровочных микросфер

Цель исследования

Изучение статуса активации тромбоцитов в зависимости от используемых сепараторов клеток при автоматическом тромбоцитаферезе.

Материалы и методы

Объектом исследования являлся КТ, полученный методом афереза у активных (кадровых) доноров с использованием аппаратов для цитафереза Trima Accel («Terumo BCT», США) и MCS+ (Haemonetics Corporation, США)

Обследование доноров проводили в соответствии с требованиями нормативных документов. Проведено исследование 56 образцов концентрата тромбоцитов, полученного методом афереза, лейкоредуцированного: 22 образцов были заготовлены на Trima Accel, 34 на MCS+. Для определения количества тромбоцитов использовали автоматический гематологический анализатор SMART 5 (URIT Medical Electronic Group Co., Ltd, Китай). Содержание тромбоцитарных микрочастиц определяли методом проточной цитометрии с использованием цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter, США) путем бокового рассеяния излучения фиолетового лазера. Разработанный протокол предусматривает набор 1000000 событий для каждого образца. Образцы анализировались в течение 30 мин после окрашивания. Согласно используемого протокола для каждого образца набиралось 106 событий.

Исследование включало следующие этапы: получение суспензии МЧ; 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.

Результаты исследования представлены в виде среднего значения. Для оценки различий между группами использовали критерий Стьюдента. Статистически значимые различия определялись при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все исследуемые концентраты тромбоцитов были заготовлены методом автоматического афереза согласно установленным требованиям. Количество тромбоцитов в КТ, заготовленных на MCS+ в день заготовки и на 5 сутки хранения значимо не отличалось и составило $878 \times 10^9/\text{л}$ против $911 \times 10^9/\text{л}$, $p > 0,05$ (рисунок 1).

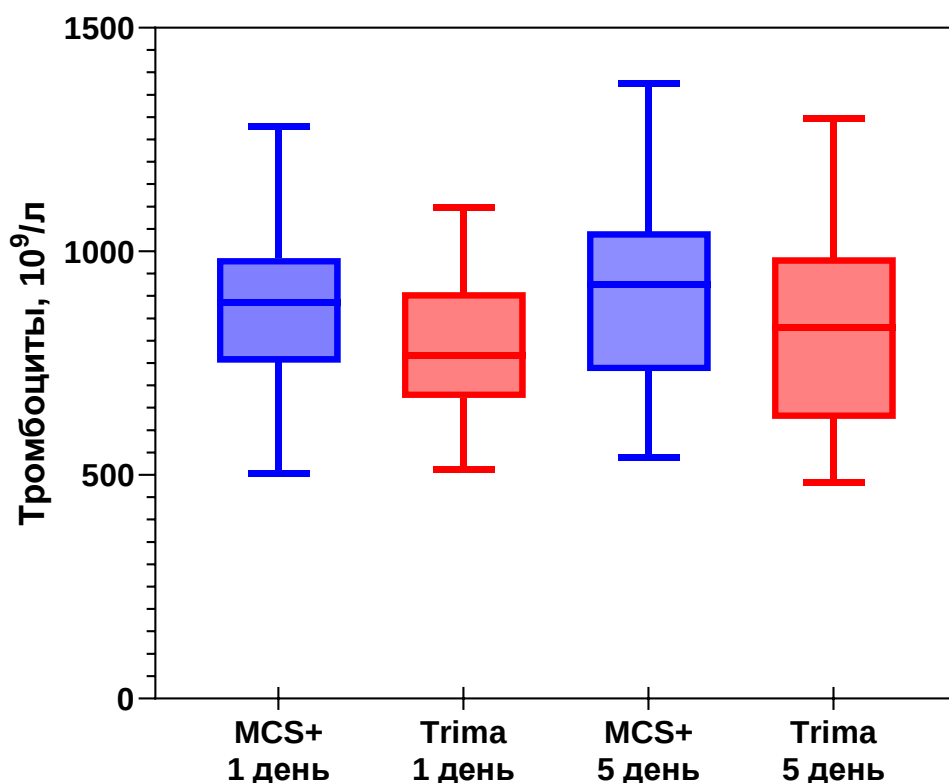


Рисунок 1. Динамика изменений количества тромбоцитов в КТ, на сроках хранения

Незначительное нарастание количества тромбоцитов к 5 суткам хранения (+3,8%) может являться следствием образования микроагрегатов в день заготовки. Уровень тромбоцитов в КТ, заготовленных на Trima Accel аналогичным образом существенно не отличался на 1 и 5 сутки, составив $786 \times 10^9/\text{л}$ и $822 \times 10^9/\text{л}$ (+4,5%) соответственно, $p > 0,05$ (рисунок 1). В свою очередь количество ТМЧ в процессе хранения КТ значимо возрастало и к 5 суткам составило 32357 для MCS+ по сравнению с 13707 в день заготовки ($p <$

0,0001, +236%), что может свидетельствовать о выраженной активации тромбоцитов (рисунок 2).

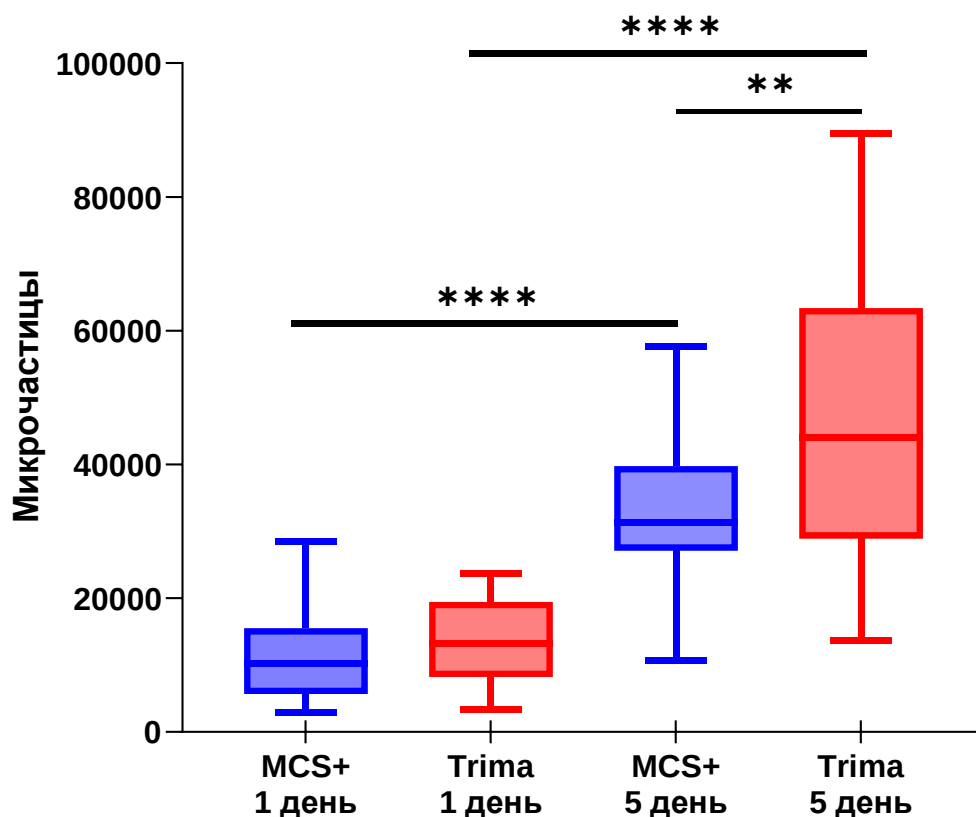


Рисунок 2. Динамика изменений количества тромбоцитарных микрочастиц на сроках хранения

Примечание: ** - $p < 0,01$, **** - $p < 0,0001$

Для Trima Accel количество ТМЧ увеличивалось на 5 сутки хранения с 13707 до 47144 (343,9%, $p < 0,0001$). Таким образом, начальная степень активации тромбоцитов значимо увеличивалась к концу срока хранения.

Важно отметить отсутствие значимых различий по содержанию микрочастиц в зависимости от используемого сепаратора в день заготовки ($p > 0,05$). В то же время к концу срока хранения уровень микрочастиц в КТ, заготовленных на Trima Accel, значимо превышал это значение при использовании MCS+ ($p = 0,003$).

Нарастание количества микрочастиц в процессе хранения концентрата тромбоцитов, в зависимости от используемого сепаратора клеток, может быть связано с различиями в строении центрифуги. При сепарации клеток аппаратами с центрифужным колоколом вымывание клеток происходит за счет силы плазмы, в результате чего агрегированные тромбоциты не попадают в контейнер для конечного хранения компонента в связи с большим удельным весом.

Заключение

Концентраты тромбоцитов имеют короткий срок годности и часто находятся в ограниченном количестве. Управление запасами концентрата тромбоцитов, основанное на анализе содержания тромбоцитов и тромбоцитарных микрочастиц, является перспективной стратегией в области повышения эффективности и безопасности трансфузионной терапии [24]. Количественное определение тромбоцитарных микрочастиц позволяет дифференцировать активированные компоненты (с высоким содержанием микрочастиц) и неактивированные (с низким содержанием микрочастиц) при переливании. Тромбоконцентраты с низкой концентрацией ТМЧ оптимально использовать для терапии пациентов онкологического и гематологического профиля. В свою очередь предварительно активированные тромбоциты имеют ограниченную жизнеспособность и не способствуют должному эффекту в отношении онкологических пациентов [25]. Напротив, для хирургических или травматологических пациентов, где имеет место острая кровопотеря, трансфузии КТ, содержащих предварительно активированные тромбоциты, будут иметь хорошую эффективность ввиду реализации повышенной гемостатической функции [26].

Рациональный подход к переливанию концентрата тромбоцитов с учетом статуса активации по содержанию тромбоцитарных микрочастиц позволит сократить оптимизировать его использование.

Список литературы

1. Simak J., Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion Medicine Reviews*. 2006; 20: 1–26.
2. Goubran H.A., Burnouf T., Stakiw J., Seghatchian J. Platelet microparticle: a sensitive physiological “fine tuning” balancing factor in health and disease. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 52: 12–18.
3. Burnouf T., Chou M-L., Goubran H., et al. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: are they clinically beneficial or harmful? *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 53: 137–45.
4. Cognasse F., Hamzeh-Cognasse H., Laradi S. et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: a concise review. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 53: 159–167.
5. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2006; 36: 182–187.
6. Keuren J.F., Magdeleyns E.J., Govers-Riemslog J.W. et al. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *British Journal of Haematology*. 2006; 134: 307–313.
7. Nantakomol D., Imwong M., Mas-Oodi S. et al. Increase membrane vesiculation in essential hypertension. *Laboratory Medicine*. 2012; 43: 6–9.
8. Viera A.J., Mooberry M., Key N.S. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2012; 6: 243–252.
9. Alijotas-Reig J., Palacio-Garcia C., Llurba E., Vilardell-Tarres M. Cellderived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertility and Sterility*. 2013; 99: 441–449.
10. Maslanka K., Uhrynowska M., Lopacz P. et al. Analysis of leucocyte antibodies, cytokines, lysophospholipids and cell microparticles in blood components implicated in post-transfusion reactions with dyspnoea. *Vox Sanguinis*. 2015; 108: 27–36.

11. Soop A., Hallstrom L., Frostell C. et al. Effect of lipopolysaccharide administration on the number, phenotype and content of nuclear molecules in blood microparticles of normal human subjects. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013; 78: 205–213.
12. Tripodi A., Branchi A., Chantarangkul V. et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011; 31: 165–172.
13. Chamouard P., Desprez D., Hugel B. et al. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2005; 50: 574–580.
14. Woei-A-Jin F.J., van der Starre W.E., Tesselaar M.E. et al. Procoagulant tissue factor activity on microparticles is associated with disease severity and bacteremia in febrile urinary tract infections. *Thrombosis Research*. 2014; 133: 799–803.
15. Woth G., Tokes-Fuzesi M., Magyarlaki T. et al. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (*Candida albicans*) sepsis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2012; 49: 554–560.
16. Pisetsky D., Ullal A.J., Gauley J., Ning T.C. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology*. 2012; 51: 1737–1746.
17. Pelletier F., Garnache-Ottou .F, Angelot F. et al. Increased levels of circulating endothelial-derived microparticles and small-size platelet-derived microparticles in psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2011; 131: 1573–1576.
18. Duarte D., Taveira-Gomes T., Sokhatska O. et al. Increased circulating platelet microparticles as a potential biomarker in asthma. *Allergy*. 2013; 68: 1073–1075.
19. Laresche C., Pelletier F., Sokhatska O. et al. Increased levels of circulating microparticles are associated with increased procoagulant activity in patients with cutaneous malignant melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134: 176–182.

20. Johnson L., Schubert P., Tan S. et al. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*. 2015; 56(2): 360–368.
21. Ayers L., Kohler M., Harrison P. et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thrombosis Research*. 2011; 127(4): 370–377.
22. Christersson C., Johnell M., Siegbahn A. Evaluation of microparticles in whole blood by multicolour flow cytometry assay. *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2013; 73(3): 229–239.
23. Freyssinet J.M., Dignat-George F. More on: measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3(3): 613–614.
24. 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.
25. Schiffer C.A., Anderson K. C., Bennett C. L. 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.
26. Getz T.M., Montgomery R.K., Bynum J.A. et al. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016; 56(6): 1320 – 1328.

References

1. Simak J., Gelderman M.P. Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion Medicine Reviews*. 2006; 20: 1–26.
2. Goubran H.A., Burnouf T., Stakiw J., Seghatchian J. Platelet microparticle: a sensitive physiological “fine tuning” balancing factor in health and disease. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 52: 12–18.

3. Burnouf T., Chou M-L., Goubran H., et al. An overview of the role of microparticles/microvesicles in blood components: are they clinically beneficial or harmful? *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 53: 137–45.
4. Cognasse F., Hamzeh-Cognasse H., Laradi S. et al. The role of microparticles in inflammation and transfusion: a concise review. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 53: 159–167.
5. Flaumenhaft R. Formation and fate of platelet microparticles. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2006; 36: 182–187.
6. Keuren J.F., Magdeleyns E.J., Govers-Riemslog J.W. et al. Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *British Journal of Haematology*. 2006; 134: 307–313.
7. Nantakomol D., Imwong M., Mas-Oodi S. et al. Increase membrane vesiculation in essential hypertension. *Laboratory Medicine*. 2012; 43: 6–9.
8. Viera A.J., Mooberry M., Key N.S. Microparticles in cardiovascular disease pathophysiology and outcomes. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2012; 6: 243–252.
9. Alijotas-Reig J., Palacio-Garcia C., Llorba E., Vilardell-Tarres M. Cellderived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. *Fertility and Sterility*. 2013; 99: 441–449.
10. Maslanka K., Uhrynowska M., Lopacz P. et al. Analysis of leucocyte antibodies, cytokines, lysophospholipids and cell microparticles in blood components implicated in post-transfusion reactions with dyspnoea. *Vox Sanguinis*. 2015; 108: 27–36.
11. Soop A., Hallstrom L., Frostell C. et al. Effect of lipopolysaccharide administration on the number, phenotype and content of nuclear molecules in blood microparticles of normal human subjects. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2013; 78: 205–213.
12. Tripodi A., Branchi A., Chantarangkul V. et al. Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011; 31: 165–172.

13. Chamouard P., Desprez D., Hugel B. et al. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 2005; 50: 574–580.
14. Woei-A-Jin F.J., van der Starre W.E., Tesselaar M.E. et al. Procoagulant tissue factor activity on microparticles is associated with disease severity and bacteremia in febrile urinary tract infections. *Thrombosis Research*. 2014; 133: 799–803.
15. Woth G., Tokes-Fuzesi M., Magyarlaci T. et al. Activated platelet-derived microparticle numbers are elevated in patients with severe fungal (*Candida albicans*) sepsis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2012; 49: 554–560.
16. Pisetsky D., Ullal A.J., Gauley J., Ning T.C. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. *Rheumatology*. 2012; 51: 1737–1746.
17. Pelletier F., Garnache-Ottou .F, Angelot F. et al. Increased levels of circulating endothelial-derived microparticles and small-size platelet-derived microparticles in psoriasis. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2011; 131: 1573–1576.
18. Duarte D., Taveira-Gomes T., Sokhatska O. et al. Increased circulating platelet microparticles as a potential biomarker in asthma. *Allergy*. 2013; 68: 1073–1075.
19. Laresche C., Pelletier F., Sokhatska O. et al. Increased levels of circulating microparticles are associated with increased procoagulant activity in patients with cutaneous malignant melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134: 176–182.
20. Johnson L., Schubert P., Tan S. et al. Extended storage and glucose exhaustion are associated with apoptotic changes in platelets stored in additive solution. *Transfusion*. 2015; 56(2): 360–368.
21. Ayers L., Kohler M., Harrison P. et al. Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thrombosis Research*. 2011; 127(4): 370–377.

22. Christersson C., Johnell M., Siegbahn A. Evaluation of microparticles in whole blood by multicolour flow cytometry assay. *The Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2013; 73(3): 229–239.
23. Freyssinet J.M., Dignat-George F. More on: measuring circulating cell-derived microparticles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3(3): 613–614.
24. 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.
25. Schiffer C.A., Anderson K. C., Bennett C. L. 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.
26. Getz T.M., Montgomery R.K., Bynum J.A. et al. Storage of platelets at 4°C in platelet additive solutions prevents aggregate formation and preserves platelet functional responses. *Transfusion*. 2016; 56(6): 1320 – 1328.