

На правах рукописи

Макаров Максим Сергеевич

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕАЛИЗАЦИИ РЕГЕНЕРАТИВНОГО
ПОТЕНЦИАЛА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА**

1.5.22 – клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор Хватов Валерий Борисович

Официальные оппоненты:

Ельчанинов Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией роста и развития Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского»

Ройтман Евгений Витальевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой онкологии, гематологии и лучевой терапии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова

Яцковский Александр Никодимович, доктор медицинских наук, профессор, профессор по кафедре анатомии и гистологии человека ФГАОУ ВО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И.М. Сеченова Минздрава России»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Московский научный исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125284, г. Москва, 2-й Боткинский пр., д. 3

Защита состоится « » 2023 г. в 12.00 на заседании диссертационного совета 24.1.204.02 по адресу: «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" по адресу: 117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» ФГБНУ "Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского" и на сайте <http://www.med.ru>

Автореферат разослан « » 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор биологических наук

Анна Михайловна Косырева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

При многих физиологических и патологических эпизодах критическое значение имеет стимуляция и регуляция репаративных процессов в ране, необходимых для восстановления нормальной структуры тканей [Ермолов А.С. и др. 2008; Ткачук В.А., 2017; Самодай В.Г. и др., 2019]. Эти процессы включают миграцию клеток в область тканевого дефекта, пролиферацию и дифференцировку клеток, формирование межклеточного матрикса. Процесс репарации и регенерации тканей может быть значительно ускорен благодаря использованию препаратов, содержащих биологически активные вещества, секретлируемые клетками [Оболенский В.Н., 2016; Mona M. et al., 2020; Nolan G.S., 2021]. Уже больше 20 лет внимание исследователей привлекают тромбоциты человека как перспективный источник факторов репарации. Гранулы тромбоцитов содержат большое количество веществ, стимулирующих пролиферацию, миграцию, секрецию клеток, а также их дифференцировку и взаимодействие друг с другом [Golebiewska E.M., Poole A.W., 2014]. Кроме того, тромбоциты обладают рядом специфических функций, напрямую влияющих на реализацию их биологического потенциала. К ним относятся способность к быстрой и массовой адгезии на различных субстратах, способность формировать агрегаты в суспензии и на поверхности субстрата, способность стимулировать полимеризацию фибрина с образованием гелеподобных структур *in vivo* и *in vitro* [Michelson A.D., 2013; Brewer C.F., 2021]. Активация тромбоцитов сопровождается выбросом биологически активных веществ в растворенном виде и в составе цельных тромбоцитарных микрочастиц, которые также могут адгезировать к субстрату [Lannan K.L., 2015]. При этом скорость и характер дегрануляции могут заметно отличаться при разных способах активации тромбоцита [Peters C.G. et al., 2012; Вуе А.Р. et al., 2016]. Кроме того, тромбоциты могут быть активированы в обход лиганд-рецепторного пути, под действием как

органических, так и неорганических соединений, а также некоторых физических факторов [Freitag J., 2012; Murphy D.D. et al., 2014; Kim D. et al., 2014]. В зависимости от особенностей фактора, скорость и характер функционального ответа тромбоцитов заметно различаются. Таким образом, в зависимости от условий тромбоциты по-разному проявляют свою биологическую активность, которая в конечном итоге влияет на реализацию их биологического потенциала. Поэтому изучение биологической активности тромбоцитов имеет большое значение для понимания принципов реализации регенеративного потенциала этих клеток и его применения в исследовательской и практической сфере.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время отсутствуют общепринятые стандарты как по производству тромбоцитных препаратов, так и по способу их применения в клинической практике. Исходным биоматериалом, как правило, выступает богатая тромбоцитами плазма (БоТП), выделенная из консервированной крови. Большинство исследователей сходятся на мнении, что для обеспечения достаточного уровня репаративных факторов БоТП должна содержать не менее 1000 тыс. тромбоцитов в 1 микролитре [Nurden P. et al., 2021]. Однако при этом практически нигде не оценивают качество тромбоцитов и их биологическую активность. Во многих работах для характеристики биологического потенциала БоТП оценивают цитокиновый состав, но при этом не проводят исследование самих тромбоцитов [Калмыкова Н.В. и др., 2011; Amable P.R. et al., 2013; Шабанов С.В., 2021]. Стоит отметить, что в составе БоТП тромбоцитарные компоненты изначально могут находиться как внутри тромбоцитов, так и за их пределами [Kim S.J. et al., 2018; Kou Y. et al., 2019]. Это связано с присутствием в исходной крови тромбоцитарных микрочастиц, а также с дегрануляцией тромбоцитов в процессе выделения БоТП. Компоненты тромбоцитарных гранул способны приводить к развитию или усилению различных патофизиологических процессов, а также вызывать осложнения уже

существующих патологий, препятствуя восстановлению поврежденных тканей [Joos H. et al., 2013; Malhotra A. et al., 2014; Hu Q. et al., 2017; Nguyen M.V.C. et al., 2019]. Не вызывает сомнения, что при лечении многих тканевых дефектов оправдано использовать лишь определенные компоненты тромбоцитарных гранул, однако возможность их выделения путем селективной (избирательной) дегрануляции тромбоцитов до сих пор не была изучена. Многообразие путей активации тромбоцитов и их высокая реактивность заметно усложняет выбор адекватного подхода к использованию тромбоцитарного материала в практических целях. Известно, что даже при стандартной процедуре краткосрочного хранения тромбоцитов не исключена вероятность их активации [Melzer M. 2012; Ayers L. et al., 2014]. В связи с этим актуальным является изучение способов регуляции экзоцитоза тромбоцитарных гранул, способов стабилизации гранул в тромбоцитах, в том числе, после их активации. Это является особенно актуальным при разработке аппликативных конструкций, насыщенных тромбоцитами. Существует возможность *in vitro* получать на основе БТП гелеобразные препараты, в составе которых тромбоциты ассоциированы с фибрином (тромбофибриновый сгусток, ТФ). Препараты на основе ТФ востребованы в стоматологии, при лечении дефектов костной ткани, хронических трофических ран [Wang C. et al., 2014; Оболенский В.Н., 2016; Santhakumar M.A. et al., 2018]. Однако в процессе выделения ТФ стандартным способом происходит быстрая дегрануляция всех биологически полноценных тромбоцитов, что повышает риск вымывания или разрушения их компонентов. Эта же проблема возникает при производстве любых биоконструкций с тромбоцитами. В литературе нет описания методик стабилизации (закрепления) гранул в тромбоцитах, вместе с тем, показано, что при определенных условиях дегрануляция тромбоцитов замедляется на фоне нормальной функциональной активности [Kuchay S.M. et al., 2012; Shrivastava S. et al., 2009, 2011]. При работе с тромбоцитами человека, при изготовлении тромбоцитных препаратов требуется мониторинг

биологической полноценности тромбоцитов, который бы включал анализ их структурной целостности и функционального состояния. Эта проблема может быть решена с помощью способа оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека [Макаров М.С. и др., 2013, 2014], основанного на окрашивании клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями. Указанный метод позволяет проводить динамическую оценку структуры и функций тромбоцитов независимо от их концентрации в пробе, а также позволяет оценить взаимодействие этих клеток с различными химическими агентами и субстратами.

Цель исследования:

Провести морфофункциональный анализ тромбоцитов человека, проявляющих разные формы биологической активности, и усовершенствовать методики реализации регенеративного потенциала тромбоцитов.

Научные задачи:

1. Определить биологические особенности тромбоцитов, влияющие на скорость их функционального ответа
2. Провести анализ морфофункциональных характеристик тромбоцитов, активированных без использования стандартных индукторов
3. Охарактеризовать возможность стабилизации секреторных везикул в составе адгезирующих тромбоцитов для сохранения их биологического потенциала
4. Оценить цитокиновый состав тромбоцитных препаратов, полученных разными способами
5. Усовершенствовать методику получения тромбофибринового сгустка с высоким содержанием ростовых факторов

- б. Оценить рост-стимулирующие, репаративные и регенеративные свойства коллагеновых матриксов с тромбоцитами человека *in vitro* и *in vivo*

Научная новизна

Впервые проведен подробный морфофункциональный анализ тромбоцитов человека на разных этапах подготовки БоТП к применению в регенеративной медицине. Исследована биологическая активность тромбоцитов у доноров разных гендерно-возрастных групп. Выявлены морфофункциональные особенности тромбоцитов, склонных к быстрой и спонтанной активации. Изучено влияние режимов центрифугирования на морфофункциональный статус тромбоцитов человека. Разработаны способы стимуляции биологической активности тромбоцитов без использования стандартных индукторов агрегации. Впервые показана возможность стабилизации тромбоцитарных гранул в составе адгезирующих и агрегирующих тромбоцитов. Разработаны методики стабилизации гранул в составе тромбоцитов с помощью наночастиц серебра, аскорбиновой кислоты, низких концентраций перекиси водорода. Впервые проведен морфофункциональный анализ тромбоцитов, подверженных *in situ* воздействию видимого ультрафиолетового и красного света. Проведен анализ цитокинового состава тромбоцитных препаратов, полученных разными способами, установлена корреляция между уровнем ростовых факторов в тромбоцитном лизате и морфофункциональными параметрами исходных тромбоцитов. Впервые показана возможность управляемой активации тромбоцитов человека при 20-22°C. Впервые *in vitro* и *in vivo* показан рост-стимулирующий эффект тромбоцитов, стабилизированных наночастицами серебра. Изучено *in vivo* влияние насыщенных тромбоцитами коллагеновых матриксов на раневой процесс у экспериментальных животных.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные раскрывают и дополняют представление о морфофункциональных свойствах тромбоцитов человека, которые могут влиять на реализацию репаративного и регенеративного потенциала тромбоцитов. Установлены принципы использования морфофункциональных методик, основанных на витальном окрашивании клеток, для оценки суммарного биологического потенциала тромбоцитарного пула. Определены формы биологической активности, которые тромбоциты человека проявляют при действии неканонических факторов активации. Полученные данные расширяют представление о механизмах экзоцитоза тромбоцитных гранул и его взаимосвязи с проявлением тромбоцитами адгезивной активности. Показана принципиальная возможность селективной дегрануляции тромбоцитов человека в условиях *in vitro* и возможность получения на основе тромбоцитов препаратов с определенным цитокиновым составом. Показана возможность оценки цитокинового состава тромбоцитных препаратов с помощью морфофункционального исследования тромбоцитов до проведения всех обработок. Установлены факторы, которые влияют на пролиферацию и жизнеспособность диплоидных клеток *in vitro* в присутствии тромбоцитных компонентов. Оптимизирована методика выделения БотП из цельной крови, разработаны подходы к активации тромбоцитов без использования стандартных индукторов, разработаны способы получения при 20-22°C тромбофибринового сгустка, обладающего рост-стимулирующим эффектом, разработан способ получения бесплазменного тромбоцитарного лизата с высоким содержанием ростовых факторов, разработаны подходы к насыщению коллагеновых матрицсов ростовыми факторами в составе тромбоцитов.

Методология и методы исследования

Данное исследование представляет собой комплексный сравнительный анализ результатов морфофункционального исследования тромбоцитов доноров (320 человек), добровольцев (10 человек), аферезных тромбоцитных концентратов (80 образцов), изучения биологической активности тромбоцитов при действии различных активирующих и стабилизирующих факторов, исследования цитокинового состава тромбоцитных препаратов, исследования эффекта тромбоцитных препаратов в культуре клеток *in vitro*, исследования эффективности тромбоцитных препаратов *in vivo* на модели экспериментального ожога IIIa степени и глубокой раны у экспериментальных животных (мыши линии Balb/c). В работе были использованы методики витального окрашивания клеток, световой и флуоресцентной микроскопии, морфометрии, цитометрии, иммуноцитохимии, статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Морфофункциональный статус тромбоцитов имеет высокую вариабельность во всех гендерно-возрастных группах доноров. У здоровых людей тромбоциты с гранулами имеют неоднородность по скорости функционального ответа.
2. Тромбоциты человека *in vitro* проявляют биологическую активность и дегранулируют под действием высоких концентраций диметилсульфоксида, перекиси водорода, аскорбиновой кислоты и наночастиц серебра, в условиях гипотонии, в условиях редокс-потенциала среды -100мВ и ниже, при воздействии низкоимпульсного лазерного света в ультрафиолетовом и красном диапазоне.
3. Тромбоцитарные гранулы могут быть стабилизированы в адгезирующих тромбоцитах с помощью тикагрелора, низких доз наночастиц серебра,

перекиси водорода и аскорбиновой кислоты. При воздействии разных концентраций наносеребра в тромбоцитах сохраняется разный объем ростовых факторов.

4. Цитокиновый состав тромбоцитных препаратов и их рост-стимулирующий эффект заметно различается в зависимости от типа препарата. В присутствии тромбоцитных препаратов *in vitro* увеличивается пролиферативная и миграционная активность диплоидных клеток человека, культивируемых на коллагеновых матриксах. Коллагеновые матриксы, насыщенные тромбоцитами, ускоряют репаративные процессы в коже, стимулируют рост сосудов и эпителизацию.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов работы подтверждена изучением научной литературы, использованием стандартных микроскопических и иммуноцитохимических методов исследования в соответствии с российскими и международными рекомендациями. В исследование включено достаточное количество серий экспериментов для осуществления корректной статистической обработки полученных данных.

Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на: Научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Достижения современной науки – медицине Подмосковья» (Москва, 2015); 6-й научно-практической конференции «Московская трансплантология: трансплантация органов. Инфекционные осложнения» (Москва, 2015); VII московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); международной конференции «Science XXI century» (Карловы Вары, Чехия, 2015); 3-м Всемирном конгрессе по клинической гемостазиологии и гемореологии, (Москва, 2016); всероссийской научно-практической конференции

«Инфекции и инфекционная безопасность в гематологии и службе крови» (Санкт-Петербург, 2016); 3-м съезде врачей неотложной медицины (Москва, 2016); научно-практической конференции «Новые технологии в скорой и неотложной медицинской помощи» (Суздаль, 2016); всероссийском конгрессе «Хирургия – XXI век: соединяя традиции и инновации» (Москва, 2016); XXI форуме «Национальные дни лабораторной медицины» (Москва, 2017); 1-й научно-практической конференции «Актуальные вопросы неотложной медицины» (Москва, 2018); 4-м съезде врачей неотложной медицины Москвы (Москва, 2018); 22-й международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2018); XXV Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2019); международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019); 23-й международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2019); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (Санкт-Петербург, 2019); V Съезде травматологов-ортопедов Сибирского федерального округа (Барнаул, 2019); научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных (Витебск, Белоруссия, 2019); XII Всероссийском симпозиуме «Биологическая подвижность» (Пушино, 2019); Пироговском форуме травматологов-ортопедов «Избранные вопросы травматологии и ортопедии» (Москва, 2019); IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019); 63 съезде международного общества «Thrombosis Haemostasis Research» (Берлин, ФРГ, 2019); XXV Всероссийской научно-практической конференции «Наука и практика лабораторных исследований» (Москва, 2020); 9-й научно-практической конференции «Московская трансплантология. Задачи сегодняшнего дня» (Москва, 2021); 24-ой международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2020); 4-й научно-практической конференции

«Актуальные вопросы неотложной медицины» (Москва, 2021); 9-й научно-практической конференции «Московская трансплантология. Задачи сегодняшнего дня» (Москва, 2021); Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Современные трансфузиологические технологии для медицинской практики. Год 2021: Клеточные технологии. И не только» (Москва, 2021); VII Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2021); 5-й международной конференции «Wound care, tissue and regenerative medicine» (Париж, Франция, 2022), III Конгрессе «ОРТОБИОЛОГИЯ 2022. От исследования к клинической практике» (Москва, 2022); VI Конгрессе Гематологов России (Москва, 2022).

Апробация работы состоялась 21 февраля 2022 года на заседании проблемно-плановой комиссии №8 «Трансплантация органов и тканей» ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты диссертационной работы в области изучения тромбоцитов человека, исследования регенеративного потенциала тромбоцитов, разработки и исследования тромбоцитных биопрепаратов используются в процессе обучения по программам дополнительного профессионального образования «Исследование морфофункционального статуса тромбоцитов человека в научной и клинической практике», «Клеточно-тканевые технологии в неотложной медицине» в отделении биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». Полученные в ходе диссертационной работы результаты внедрены в практику отделения гнойной хирургии ГКБ № 13 города Москвы и отделения неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Личный вклад автора

Автором лично определена концепция и дизайн диссертационного исследования, сформулированы его цель и задачи. Автор лично готовил витальные красители для тромбоцитов и диплоидных клеток, лично проводил все экспериментальные обработки тромбоцитов, принимал участие в производстве трансплантатов, насыщенных тромбоцитами, непосредственно проводил все микроскопические исследования витально окрашенных препаратов и гистологических препаратов, участвовал в проведении иммуноцитохимических исследований, осуществлял анализ полученных результатов и их статистическую обработку. Автором разработана подробная методика получения тромбофибринового сгустка с высоким содержанием ростовых факторов, методика изготовления коллагеновых матриц, насыщенных тромбоцитами. Автор принимал непосредственное участие в подготовке научных публикаций, посвященных теме настоящей диссертации.

Публикации

По материалам диссертационного исследования опубликовано 69 работ, включая 30 статей, из них 25 – в журналах, рекомендованных ВАК, 12 – в журналах Web of Science, 10 – в журналах Scopus, тезисы 35 докладов на научно-практических конференциях и конгрессах, 3 патента на изобретение, 1 методические рекомендации.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа построена по классической схеме, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 6 глав с результатами собственных исследований и заключением, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и указателя использованной литературы, включающего 91 отечественный источник и 223 зарубежных

источника. Диссертация изложена на 279 страницах, иллюстрирована 25 таблицами и 68 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Научно-исследовательская работа проведена в течение 2015-2022 гг. в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского на базе отделения биотехнологий и трансфузиологии, отделения консервирования тканей и производства трансплантатов и отделения экспериментальной патологии. В работе исследовали тромбоциты крови доноров (320 человек), добровольцев (10 человек), аферезных тромбоцитных концентратов (80 образцов). Все доноры и добровольцы были здоровыми и дали информированное согласие. Проводили исследование биологической активности тромбоцитов при действии различных активирующих и стабилизирующих факторов, исследование цитокинового состава тромбоцитных препаратов, исследование эффекта тромбоцитных препаратов в культуре клеток *in vitro*, исследования эффективности тромбоцитных препаратов *in vivo* на модели экспериментального ожога IIIa степени и глубокой механической раны у экспериментальных животных (75 белых мышей линии Balb/c). Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с директивой Европейского парламента 2010/63/EU «О защите животных, используемых в экспериментальных целях» (от 22 сентября 2010 г.). На проведение работы было получено разрешение комитета по биомедицинской этике Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы» (протокол № 11-21 от 23 декабря 2021 г). Работа проведена на 75 белых мышах линии Balb/c (инбредные). В работе были использованы методики витального окрашивания клеток, световой и флуоресцентной микроскопии, морфометрии, цитометрии, иммуноцитохимии, статистического анализа.

На примере культуры клеток исследовали рост-стимулирующий и другие биологические эффекты тромбоцитных препаратов и матриксов, насыщенных тромбоцитами. В работе использовали культуру фибробластов человека линии М-22 10-20 пассажа, культуру фибробластов кожи кадавера 2-4 пассажа и культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга тканевых доноров 3-9 пассажа. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США) при 37°C и концентрации CO₂ 5%, при смене среды через каждые 3 суток. Исследование репаративного и регенеративного эффекта тромбоцитных препаратов *in vivo* проводили на 2 моделях – экспериментального ожога IIIa степени и глубокой механической раны. В качестве раневых покрытий использовали коллагеновые повязки и образцы дермального матрикса без тромбоцитов (контроль); покрытия, насыщенные интактными (нестабилизированными) тромбоцитами, покрытия с тромбоцитами, предварительно инкубированными с 2,5 мкМ наносеребра. В наркоз животных вводили путём внутрибрюшинного введения кетамина в дозе 20 мкл на 1 г веса животного. Для предотвращения констрикции раны в области холки мышам сбрасывали шерсть и подшивали повинилхлоридное кольцо диаметром 12 мм. Площадь раневого дефекта во всех случаях составляла 2% поверхности тела. Вывод животных из эксперимента проводили на 3 и 5 сутки в опытах по лечению экспериментального ожога и на 3, 14 и 21 сутки в опытах по лечению глубокой механической раны.

Работа с тромбоцитами и компонентами крови

В зависимости от цели исследования из венозной крови доноров получали сыворотку крови, а также следующие препараты:

- Плазма с тромбоцитами, полученная путем пассивной седиментации в вертикальном столбе жидкости (ПассПл)
- Богатая тромбоцитами плазма (БТП) – суспензия тромбоцитов в плазме с концентрацией лейкоцитов менее $1,5 \cdot 10^9/\text{л}$

- Богатая тромбоцитами плазма с высоким содержанием лейкоцитов (ЛейкБоТП) – препарат на основе суспензии тромбоцитов в плазме с концентрацией тромбоцитов более $1000 \cdot 10^9/\text{л}$, лейкоцитов – более $15 \cdot 10^9/\text{л}$
- Бедная тромбоцитами плазма (БедПл) – суспензия тромбоцитов в плазме с концентрацией тромбоцитов менее $100 \cdot 10^9/\text{л}$
- Тромбоциты, отмытые от плазмы (ОтмТр) – суспензия тромбоцитов в бесплазменной среде с той же концентрацией клеток, что и в БоТП
- Активированная богатая тромбоцитами плазма (АктБоТП) – бесклеточный препарат на основе БоТП, полученный в результате активации плазмы хлоридом кальция
- Лизат богатой тромбоцитами плазмы – бесклеточный препарат на основе БоТП, полученный в результате криодеструкции тромбоцитов

Из консервированной крови тромбоциты выделяли при $20-22^\circ\text{C}$, из неконсервированной крови – при $4-16^\circ\text{C}$. Сыворотку крови получали стандартным способом путем центрифугирования цельной неконсервированной крови с ускорением 3000 g в течение 20 минут. Для пассивного выделения плазмы с тромбоцитами консервированную кровь доноров экспонировали в вертикальном столбе жидкости в течение 1 часа при $20-22^\circ\text{C}$, с последующим отбором супернатантной плазмы.

Базовая методика получения БоТП включала два этапа: центрифугирование крови с ускорением $300-350 \text{ g}$, в течение 4-5 минут отбор супернатантной плазмы с тромбоцитами, которую затем концентрировали путем центрифугирования с ускорением 700 g в течение 17 минут для осаждения тромбоцитов. Из пробирки отбирали верхнюю часть плазмы (бедную тромбоцитами, БедПл), затем ресуспендировали осадок тромбоцитов в оставшемся объеме плазмы. Для получения ЛейкБоТП при отборе первичной плазмы с тромбоцитами захватывали фракцию лейкоцитов, затем проводили центрифугирование при 300 и 700 g , как в базовой методике. Для получения АктБоТП использовали 10%-ный раствор

хлорида кальция. Для получения ОтмТр проводили двухэтапное центрифугирование тромбоцитов с теми же режимами, как и при получении БоТП, после получения осадка тромбоцитов удаляли всю жидкую фракцию и вносили равный ей объем фосфатно-солевого раствора PBS или изотонического 0,9%-ного раствора хлорида натрия. Для получения тромбоцитарных лизатов использовали БоТП, БедПл, ЛейкБоТП и ОтмТр. Криодеструкцию тромбоцитов проводили при температуре $-40/-80^{\circ}\text{C}$, при этой же температуре образцы хранили и размораживали непосредственно перед исследованием. Разморозку проб проводили в медленном режиме при $+2/+4^{\circ}\text{C}$ в течение 12 часов, после этого пробы центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут с целью удаления всех клеточных фрагментов.

Исследование биологической активности тромбоцитов

В работе исследовали морфофункциональные особенности тромбоцитов доноров после активации следующими факторами: низкие и средние дозы АДФ (0,5 мкМ, 1 мкМ, 2,5 мкМ); адгезия на предметном стекле в условиях инкубации при 37°C ; 5-40% раствор диметилсульфоксида; перекись водорода в концентрации 40-600 мкМ; растворы с пониженной тоничностью (0,11 М, 0,1 М и 0,075М) и повышенной тоничностью (0,3М, 0,5М и 0,6М); редокс-потенциал в диапазоне -120 мВ до +120 мВ; низкоимпульсное лазерное излучение ультрафиолетовым ($\lambda=408$ нм), голубым ($\lambda=488$ нм), зеленым ($\lambda=543$ нм) и красным светом ($\lambda=637$ нм); адреналин в концентрации 0,6-1 мг/л.

В процессе разработки способов стабилизации гранул в составе адгезирующих тромбоцитов использовали вещества, способные блокировать активацию тромбоцитов. Стабилизацию тромбоцитарных гранул стимулировали с помощью следующих факторов: антиагрегант прямого действия тикагрелор в концентрации 0,5-10 мг/л; наночастицы серебра в концентрации 0,05-15 мкМ; перекись водорода в концентрации 20-75 мкМ; аскорбиновая кислота в концентрации 0,1-5 мМ.

Лабораторные исследования

Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили с помощью оригинального метода, включающим окрашивание клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями на основе триафлавина и акридинового оранжевого с последующим их анализом во флуоресцентном микроскопе [Макаров М.С. и др., 2013]. Исследование тромбоцитов включало анализ следующих параметров:

- общее количество клеток в крови и в плазме (тыс/мкл или 10^9 /л).
- содержание тромбоцитов с гранулами, относительное, Дтр.гр. (%) и абсолютное, Стр.гр. (тыс/мкл или 10^9 /л)
- морфофункциональная активность тромбоцитов, МФАТ (в баллах).
- адгезивная активность тромбоцитов (ААТ) на стекле (в баллах).
- морфофункциональный статус тромбоцитов, МФСТ (в баллах).
- доля тромбоцитов, богатых гранулами (%)
- доля клеток с выраженной ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов (%);
- доля адгезировавших тромбоцитов с гранулами (%);
- средняя яркость цитоплазмы тромбоцитов, Яцит (фут-кандел);
- сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах, $S_{x_{гр}}$ (%).
- наличие и размер тромбоцитарных агрегатов при воздействии активирующих и стабилизирующих факторов.
- коэффициент чувствительности тромбоцитов к низким дозам АДФ, КЧадф (%).
- уровень тромбоцитов с гранулами в составе раневых покрытий (млн)

Исследование цитокинового состава тромбоцитных препаратов проводили с использованием платформы Luminex. Содержание цитокинов оценивали с помощью мультиплексного анализа на платформе Luminex 200 (технология xMAP), используя набор EMD Millipore's MILLIPLEXmap HUMAN Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit. Определяли

концентрацию тромбоцитарного фактора роста PDGF, фактора роста фибробластов FGF-2, фактора роста эндотелия EGF, трансформирующего фактора роста TGF- α , фактора некроза опухолей TNF- α , интерлейкинов 1 (IL1- α), 6 (IL 6), 8 (IL 8), фактора роста эндотелия сосудов VEGF в пг/мл.

В работе использовали конфокальный микроскоп «Nikon Eclipse 80i», совмещенный с флуоресцентной лампой «Nikon Intesilight C-HGF α » (Nikon Corporation, Япония). Для получения флуоресцентного изображения окрашенных тромбоцитов и диплоидных клеток человека использовали синий светофильтр с λ возбуждения 450-490 нм, λ эмиссии – от 520 нм, время экспозиции 0,25-1 с. Для оценки автофлуоресценции коллагена в гистологических препаратах использовали зеленый светофильтр (λ возбуждения – 510-560 нм, λ эмиссии – от 575 нм, время экспозиции – 1 с). Гистологические препараты раневого очага изготавливали по стандартной методике, окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Полученные статистические данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ «IBM SPSS Statistics 22». Вычисляли среднее значение (M), среднеквадратичное отклонение (σ), медиану (Me), 1-й и 3-й квартили (25%; 75%). Проверку распределения на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова-Смирнова. Для сравнения количественных данных в двух несвязанных между собой выборках использовали t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни для независимых переменных и критерий Вилкоксона для связанных выборок. Для сравнения 3 и более групп в несвязанных выборках применяли параметрический критерий Стьюдента для множественных сравнений и непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Корреляционный анализ проводили путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмана, r (непараметрические корреляции). Различия между значениями считали достоверными при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические особенности тромбоцитов, влияющие на скорость их функционального ответа

В данной работе были обследованы образцы крови, заготовленные как у кадровых, так и у первичных доноров. Выявлено, что в венозной крови первичных и кадровых доноров содержание тромбоцитов с гранулами составляло 54 [47;61] % и 60 [53;65] %, уровень МФСТ– 101 [85;109] баллов и 119 [105; 126] баллов соответственно. Уровень МФСТ у кадровых доноров был выше по сравнению с первичными донорами ($p=0,04$), с другой стороны, в обеих группах отмечена высокая неоднородность по морфофункциональным параметрам тромбоцитов. Не было выявлено корреляции между возрастом донора и его морфофункциональными параметрами. Среди доноров-мужчин все возрастные группы имели сходные значения Dтр.гр. и МФСТ, у доноров-женщин содержание тромбоцитов с гранулами в группе от 40 до 49 лет было достоверно ниже по сравнению с остальными возрастными группами ($p<0,05$). Среди обследованных доноров у 88% мужчин и 90% женщин отмечена низкая чувствительность тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ, значение КЧадф не превышало 20%, т.е. 0,5 мкМ АДФ вызывало дегрануляцию не более 20% всех тромбоцитов с гранулами, образующиеся агрегаты быстро распадались или были очень мелкими. У остальных доноров чувствительность тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ была высокой, КЧадф варьировал от 40 до 80%. Среди доноров с низкой чувствительностью тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ среднее значение КЧадф составило у мужчин 10 [7;12]%, у женщин – 8 [5;11]% ($p>0,05$), среди доноров с высокой чувствительностью – соответственно 66 [50;70]% и 49 [42;54]% ($p<0,05$). Таким образом, в группе с высокой чувствительностью тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ у доноров-мужчин наблюдалась большая склонность тромбоцитов к необратимой активации под действием указанной

дозы АДФ. При других концентрациях АДФ (1 мкМ и 2,5 мкМ) различия по КЧадф среди мужчин и женщин не отмечено.

Морфофункциональное исследование тромбоцитов, контактировавших со стеклом в течение 10-15 минут, позволило выявить 3 субпопуляции: 1-й тип – тромбоциты без широких выростов цитоплазмы (ламеллоподий), которые имели лишь узкие псевдоподии, но при этом очень быстро смещали гранулы к клеточной границе (рис. 1А); 2-й тип – тромбоциты, образующие ламеллу на определенном участке клетки, но не по всему периметру (рис. 1Б); 3-й тип – тромбоциты с выраженной, очень широкой ламеллой, охватывающей весь периметр клетки (рис. 1В). В адгезирующих тромбоцитах 1-го и 2-го типа основная часть выявляемых гранул расположена вдоль клеточной границы или даже частично выходит за ее пределы. Напротив, в тромбоцитах 3-го типа основной объем гранул сосредоточен в центральной части клетки, в зоне т.н. грануломера. Через 10-15 минут адгезии на стекле доля тромбоцитов 3-го типа была невысокой у всех доноров и составляла 10 [9; 14] %. Соотношение клеток 1-го и 2-го типа могло заметно варьировать у разных доноров, однако во всех случаях подавляющее большинство тромбоцитов с гранулами через 10-15 минут контакта со стеклом не формировали ламеллы по всему периметру клетки.

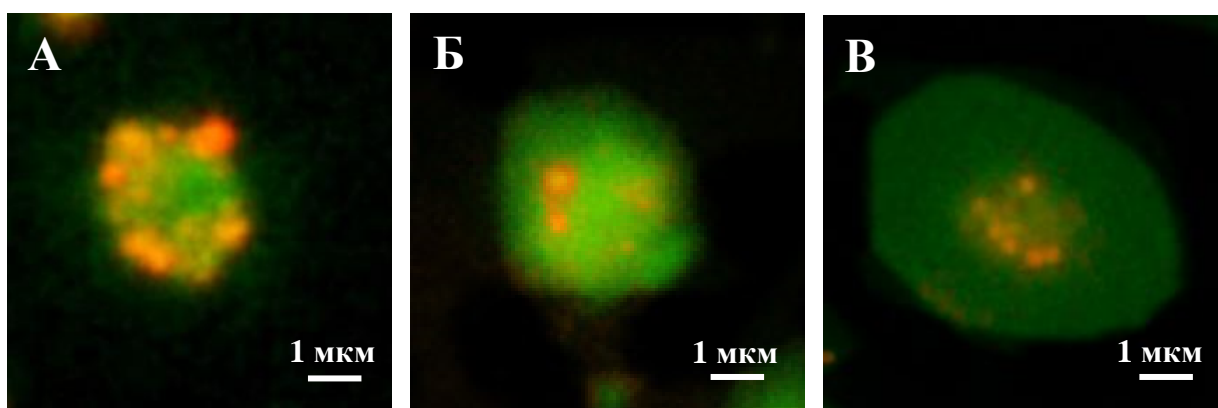


Рисунок 1 – Разная интенсивность роста ламеллы в адгезирующих тромбоцитах человека после 10-15 минут контакта со стеклом. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым.

А – тромбоцит без ламеллы; Б – тромбоцит с умеренным ростом ламеллы; В – тромбоцит с сильным ростом ламеллы.

С другой стороны, в процессе длительной экспозиции на стекле при 37°C (30 мин и более) тромбоциты 1-го и 2-го типа постепенно формировали широкую ламеллу. У доноров крови через 1-2 часа контакта со стеклом практически все адгезирующие тромбоциты были клетками 3-го типа (рис. 12В), их доля составляла 92 [90; 94]%. Стоит особо отметить, что адгезирующие тромбоциты 1-го типа (без ламеллоподий) через 10-15 минут с момента адгезии могли образовывать мелкие агрегаты, в составе которых клетки очень быстро дегранулировали. Была выявлена тесная корреляция между содержанием тромбоцитов 1-го типа и значением КЧадф при 0,5 мкМ АДФ ($r=0,822$, $p=0,000$). Было установлено, что тромбоциты, изначально не содержащие гранул, способны пассивно участвовать в образовании тромбоцитарных агрегатах после активации высокими дозами АДФ.

Способы стимуляции биологической активности тромбоцитов без использования стандартных индукторов агрегации

Влияние высоких концентраций диметилсульфоксида

Диметилсульфоксид (ДМСО) является одним из наиболее известных апротонных растворителей [Гулякин И.Д. и др., 2014], однако детальных исследований влияния ДМСО на тромбоциты не проводилось. После введения в пробы БоТП высоких доз ДМСО наблюдалась дегрануляция всех биологически полноценных тромбоцитов, при 30% и 40% ДМСО этот процесс занимал всего 10 мин. Начиная с концентрации 20%, присутствие ДМСО в БоТП вызывало формирование фибриновых и тромбофибриновых сгустков, отчетливо различимых во флуоресцентном микроскопе и при окрашивании на фибрин по Вейгерту. В составе сгустков значительная часть клеток была расположена дискретно (рис. 2). Размеры выявляемых сгустков сильно варьировали, однако их максимальные значения увеличивались с ростом концентрации ДМСО в пробе. В ходе работы установлена выраженная корреляционная связь между степенью дегрануляции тромбоцитов, богатых гранулами, и диаметром сгустков ($r=0,92$, $p=0,000$).

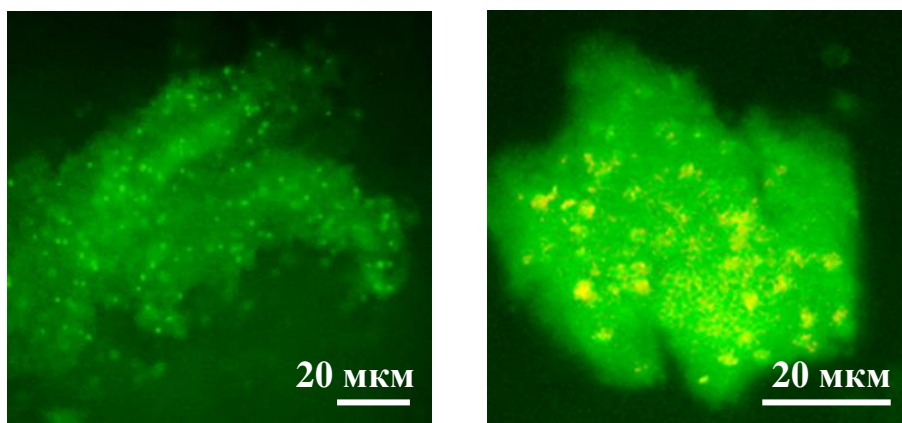


Рисунок 2 – Тромбофибриновый сгусток в БоТП через 5 мин экспозиции с 40% ДМСО. Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым.

Влияние тоничности раствора на морфофункциональные свойства тромбоцитов

В условиях 0,075-0,11М NaCl все тромбоциты с гранулами имели округлую форму, характерную тромбоцитов ранней стадии активации. Гранулы в составе тромбоцитов были заметно увеличены в диаметре и связаны с плазматической мембраной лишь в течение 5-10 мин воздействия. Формирование агрегатов было наиболее выражено при 0,11М NaCl – в этом случае 90-95% клеток с гранулами выявлялись в составе крупных агрегатов (рис. 3а). В гипертонической среде активации тромбоцитов не происходило – напротив, в условиях гипертонии тромбоциты деформировались и теряли способность к адгезии (рис. 3б). При 0,6М адгезивная активность полностью исчезала через 2,5 часа, при NaCl – через 15 мин, при 1М NaCl – через 1-2 мин.

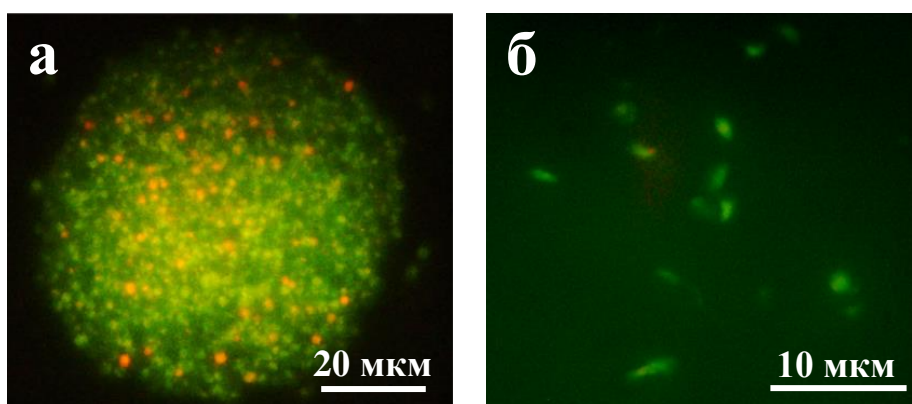


Рисунок 3 – Тромбоциты в условиях гипотонии 0,011М NaCl (а) и гипертонии 0,6М NaCl (б) при 22°С. Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым.

Влияние НИЛИ на морфофункциональные свойства тромбоцитов

Низкоимпульсное лазерное излучение (НИЛИ) в голубом ($\lambda=488$ нм) и зеленом ($\lambda=543$ нм) диапазоне не вызывало никаких изменений в морфофункциональном статусе тромбоцитов, тромбоциты сохраняли такую же структуру, как в образцах до воздействия НИЛИ (рис. 4а). При воздействии красного света уже через 0,5-1 мин в тромбоцитах наблюдалось смещение гранул к клеточной периферии и клеточной границе, а через 5 мин облучения 20-23% тромбоцитов уже дегранулировали. Одновременно с этим наблюдалось изменение формы тромбоцитов – через 1-5 мин облучения тромбоциты с гранулами увеличивали свой диаметр, становясь более уплощенными, у некоторых клеток в суспензии можно было видеть выпячивания плазматической мембраны (рис. 4б). Воздействие ультрафиолетового света ($\lambda=408$ нм) оказывало эффект, аналогичный действию красного света, однако скорость дегрануляции тромбоцитов была несколько меньше. Через 5 минут облучения уровень тромбоцитов с гранулами в суспензии значимо не менялся, через 15 минут дегранулировали 50% тромбоцитов, через 30 мин – 85%, через 60 мин – 93%. Активация тромбоцитов под действием ультрафиолетового и красного НИЛИ сопровождалась образованием агрегатов на поверхности стекла (рис. 4в).

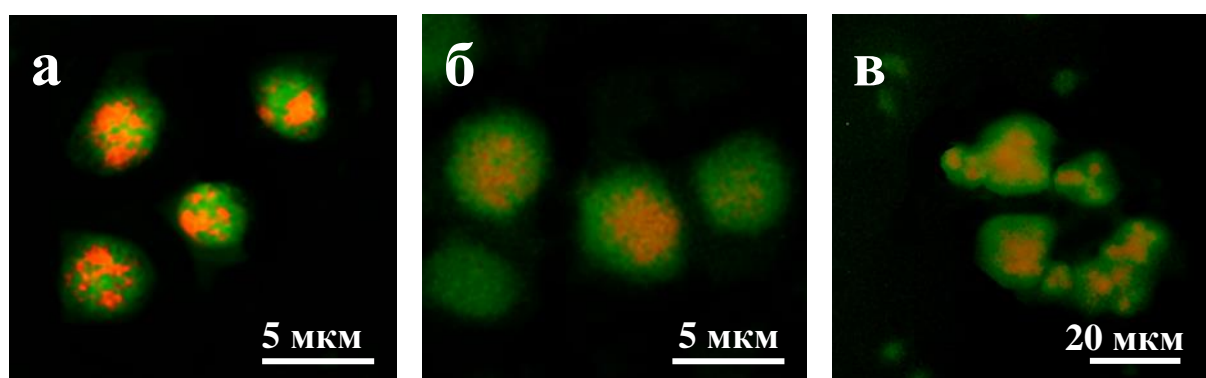


Рисунок 4 – Морфология тромбоцитов человека после воздействие модулированного лазерного света *in situ*. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. а – исходные тромбоциты (контроль); б – облучение тромбоцитов красным светом ($\lambda=637$ нм) в течение 15 мин; в – облучение тромбоцитов УФ-светом ($\lambda=408$ нм).

Способы стабилизации секреторных везикул в составе адгезирующих тромбоцитов

Стабилизация с помощью тикагрелора

Тикагрелор является антиагрегантом прямого действия, который не требует метаболической переработки и способен сразу взаимодействовать с тромбоцитами [Anderson S.D. et al., 2010]. Было сделано предположение, что воздействие тикагрелора на адгезировавшие тромбоциты вызовет подавление дальнейших этапов их активации. Экспозиция БоТП с субстратами адгезии в течение 5-7 мин при 37°C до внесения тикагрелора сопровождалась активной адгезией тромбоцитов. Применение 15 мг/л тикагрелора позволило сохранить значительную часть адгезировавших тромбоцитов в неактивированном состоянии: через 1 час экспозиции гранулы сохранялись в 88-90% клеток при адгезии на стекле и в 75% клеток при адгезии на коллагеновой повязке; через 24 часа – соответственно в 87% и 74%. Динамика изменения МФАТ была сходной. В присутствии тикагрелора адгезирующие тромбоциты сохраняли гранулы в своем составе в течение 24 часов, однако при добавлении в среду 5-10 мкМ адреналина происходила массовая дегрануляция тромбоцитов в течение 10 мин. При исследовании эффекта разных доз тикагрелора было установлено, что концентрации 5 и 10 мг/л не оказывали видимого действия на адгезивную активность тромбоцитов. В опытах с 25 и 30 мг/л тикагрелора рост ламеллы и адгезия на стекле полностью отсутствовали. В присутствии 35 мг/мл тикагрелора эффект ингибирования роста ламеллы был уже меньше, чем при 25-30 мг/л тикагрелора. При дозах тикагрелора 50-100 мг/л еще до контакта со стеклом в тромбоцитах с гранулами наблюдалось изменение морфологии, снижение яркости цитоплазмы и разрушение гранул, при этом более 80% тромбоцитов с гранулами могли контактировать со стеклом, у 20-30% тромбоцитов с гранулами формировалась ламелла. Таким образом, избыточные дозы тикагрелора уже не оказывают желаемого блокирующего действия на тромбоциты и к тому же могут быть токсичными для

тромбоцитов. Для блокировки адгезии тромбоцитов *in vitro* наиболее эффективной является доза 30 мг/л тикагрелора.

Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека в условиях контакта с наночастицами серебра

В присутствии 0,05-5 мкМ наночастиц серебра в течение 24 часов не наблюдалось видимого изменения структуры тромбоцитов как при 22°C, так и при 37°C. Концентрации 0,05-0,1 мкМ наносеребра не влияли на рост ламеллы адгезирующих тромбоцитов, стабилизация гранул внутри тромбоцитов также отсутствовала. При увеличении концентрации наносеребра от 1 до 5 мкМ наблюдалось постепенное увеличение числа клеток, неспособных формировать ламеллу. Одновременно с этим увеличивалось число клеток, в которых при адгезии на стекле полностью или частично сохранялись гранулы. Наибольший объем гранул в тромбоцитах сохранялся после предварительной их инкубации с 2,5 мкМ наносеребра в течение 1 часа. В этом случае адгезирующие тромбоциты сохраняли порядка 50% всех гранул от их исходного количества на клетку. При этом гранулы выявлялись как в центральной части цитоплазмы тромбоцитов, так и на периферии (рис. 5а). В пробах с 1-5 мкМ наносеребра, инкубированных в течение 1 часа, параметр $S_{x_{гр}}$ достигал максимальных значений, через 2 часа несколько снижался и при более длительном инкубировании уже не менялся.

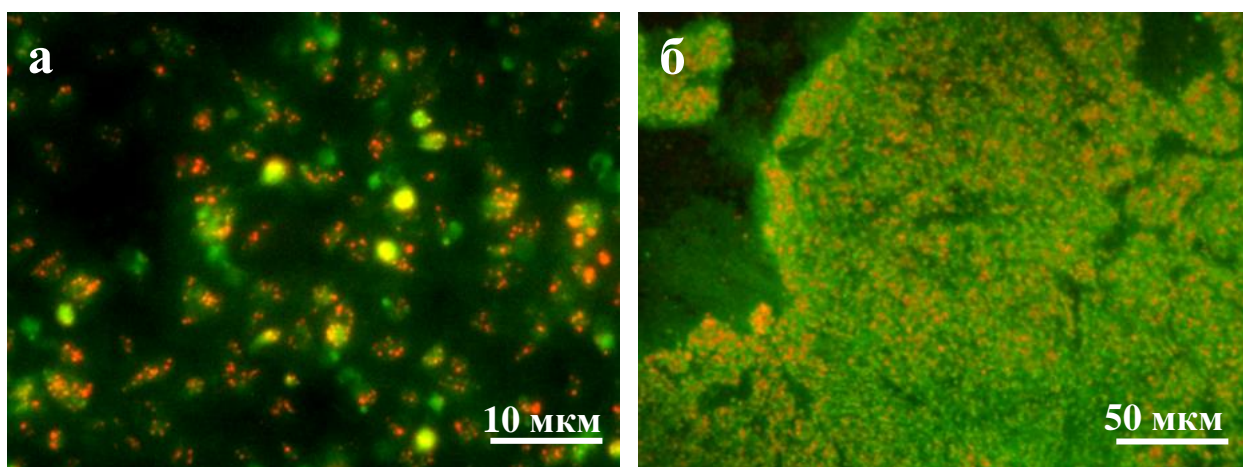


Рисунок 5 – Тромбоциты, предварительно инкубированные с 2,5 мкМ наносеребра (а) и 100 мкМ наносеребра (б), через 2 часа после адгезии на стекле. Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым.

При концентрации наночастиц серебра 15 мкМ и выше у тромбоцитов с гранулами полностью подавлялась способность к образованию ламеллоподий. При 50-100 мкМ наносеребра происходила спонтанная активация тромбоцитов, которая сопровождалась их массовой дегрануляцией и образованием тромбофибриновых сгустков и крупных тромбоцитарных агрегатов (рис. 5б). Добавление наносеребра в концентрации 0,05-5 мкМ к адгезирующим на стекле тромбоцитам практически не влияет на их способность к образованию ламеллы. С другой стороны, рост ламеллы не препятствовал сохранению гранул в адгезирующих тромбоцитах (рис. 6а, б). Как и в случае предварительной инкубации, сохранность гранул в тромбоцитах при 0,05-5 мкМ наносеребра носила дозозависимый характер. Наибольшее значение $S_{x_{гр}}$ выявлено в образцах КТ, стабилизированных с помощью 5 мкМ наночастиц серебра. Через 1-2 часа инкубации тромбоциты сохраняли 75-77% гранул, через 24 часа – около 70%. Добавление к адгезирующим тромбоцитам наносеребра в концентрации 15 мкМ и выше вызывало неоднозначный эффект: при 15 мкМ наносеребра рост ламеллы полностью отсутствовал, но при этом наступала быстрая дегрануляция всех биологически полноценных клеток (рис. 6в). Таким образом, наночастицы серебра не только снижают рост тромбоцитарной ламеллы, как это было показано ранее [Shrivastava S. et al., 2009, 2011], но также позволяют управлять дегрануляцией тромбоцитов *in vitro*.

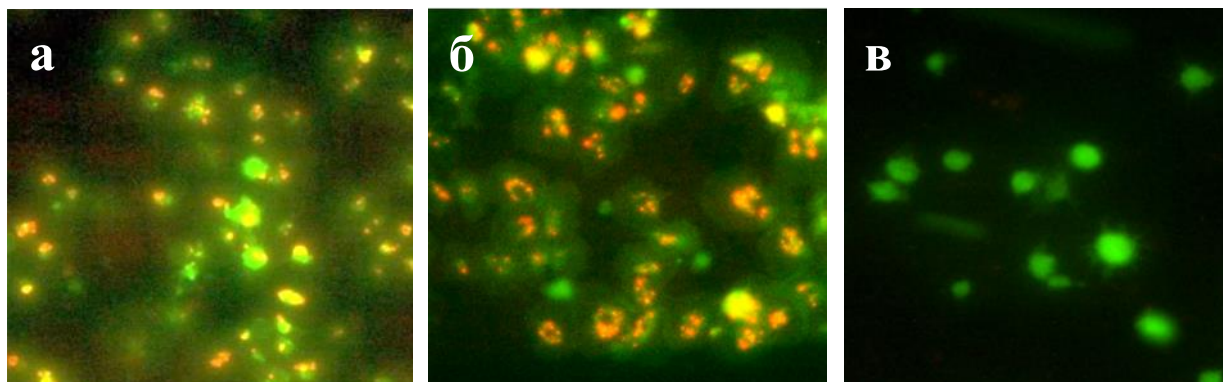


Рисунок 6 – Адгезирующие на стекле тромбоциты через 2 часа после обработки наночастицами серебра (а – 1,5 мкМ, б – 5 мкМ, в – 15 мкМ). Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение x2000.

Влияние перекиси водорода на морфофункциональный статус тромбоцитов

В присутствии 20-80 мкМ H_2O_2 в БоТП не наблюдалось видимых изменений структуры тромбоцитов как при 22°C, так и при 37°C. Под действием 400 мкМ H_2O_2 тромбоциты оставались интактными при 22°C, однако при 37°C отмечено постепенное снижение их морфофункциональной и адгезивной активности, при этом в суспензии можно было выявить агрегаты диаметром 20-40 мкм. Под действием 600 мкМ H_2O_2 спонтанная агрегация тромбоцитов наблюдалась уже через 10 минут после начала экспозиции: в условиях 22°C через 2 часа образовывались многочисленные мелкие агрегаты (до 10 мкм), при 37°C тромбоциты сначала формировали крупные конгломераты до 300 мкм, которые затем распадались на агрегаты диаметром 30-40 мкм. Обработка тромбоцитов на ранних стадиях адгезии низкими дозами H_2O_2 не препятствовала дальнейшей адгезии и дегрануляции тромбоцитов, однако на фоне дегрануляции адгезирующих тромбоцитов не наблюдалось тотальной активации тромбоцитов в суспензии. В опытах, где тромбоциты предварительно инкубировали с 20-75 мкМ H_2O_2 , было показано, что 20 мкМ H_2O_2 практически не влияет на рост ламеллы адгезирующих тромбоцитов и их дегрануляцию. При 30-60 мкМ H_2O_2 значительная часть тромбоцитов утрачивала способность формировать ламеллу, одновременно с этим часть объема гранул сохранялась в адгезирующих тромбоцитах. Наибольшая сохранность тромбоцитарных гранул отмечена в образцах, инкубированных с 60 мкМ H_2O_2 , составляя 59%. В диапазоне концентраций H_2O_2 от 30 до 60 мкМ отмечен дозозависимый эффект подавления роста ламеллы и дегрануляции в тромбоцитах. При 75 мкМ H_2O_2 сохранность гранул была уже ниже, чем при 60 мкМ и соответствовала тому, что наблюдалось при 45 мкМ.

Стабилизация с помощью аскорбиновой кислоты

Аскорбиновая кислота (АсК) широко используется в качестве антиоксиданта при неотложных состояниях, сопровождающихся системной

воспалительной реакцией [Трегубова И.А. и др., 2012; Shyu, K.G. et al., 2014]. Проведенный морфофункциональный анализ показал, что при концентрации АсК от 0,1 до 0,5 мМ тромбоциты человека сохраняли нормальную структурную целостность и адгезивную активность, однако *in vitro* наблюдалось резкое снижение агрегационной активности тромбоцитов. При 0,5 мМ АсК только у 10% адгезирующих клеток наблюдался интенсивный рост ламеллы, при концентрации 1-2 мМ АсК адгезирующие тромбоциты с гранулами формировали только отдельные тонкие псевдоподии. В условиях 1-3 мМ АсК происходила спонтанная агрегация тромбоцитов с последующей быстрой дезагрегацией, в результате чего через 30 мин содержание тромбоцитов с гранулами в плазме достоверно снижалось – на $25,6 \pm 1,2\%$ при 1 мМ АсК и на $41,0 \pm 2,4\%$ при 2-3 мМ АсК. При 5 мМ АсК уже через 10 мин тромбоциты образовывали многочисленные псевдоподии, характерные для стадии необратимой активации, не содержали гранул и не проявляли адгезивной активности. В опытах с 1 мМ АсК отмечен эффект стабилизации гранул в неактивированных тромбоцитах: после 2 часов адгезии на стекле в присутствии 1 мМ АсК адгезирующие тромбоциты сохраняли в среднем 74% от общего числа гранул.

Оценка цитокинового состава тромбоцитных препаратов

На начальном этапе проводили морфофункциональный анализ клеток исходной крови доноров, а также образцов БоТП, ЛейкБоТП, ОтмТр, БедПл, ПассПл, из которых впоследствии были получены лизаты. В образцах БоТП и ЛейкБоТП общая концентрация тромбоцитов и содержание среди них клеток с гранулами значимо не различались ($p < 0,05$). В образцах БедПл концентрация тромбоцитов была в среднем в 19,4 раза ниже по сравнению с БоТП. После отмывания тромбоцитов от плазмы не происходило значимого нарушения их качества – в образцах с отмытыми тромбоцитами общая концентрация клеток и их морфофункциональный статус были сопоставимы с тем, что наблюдалось в БоТП. Анализ цитокинового состава показал, что в сыворотке крови уровень всех ростовых факторов, за исключением PDGF,

был низким и не превышал 100 пг/мл. При сравнении цитокинового состава сыворотки и тромбоцитных препаратов выявлено, что концентрация всех исследуемых цитокинов в препаратах БоТП и ОтмГр была значительно выше, чем в сыворотке (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание цитокинов в тромбоцитных препаратах разных типов (пг/мл)

Фактор	сыворотка	Лизат БоТП	Лизат БедПл	Лизат ОтмГр
EGF	77,6 [52; 98] *	812 [804; 926] +	67 [57; 117] *	4297 [4213; 8465] * +
FGF-2	46 [40; 50] * +	237 [149; 297]	266 [179; 300]	724 [387; 1443] *
IL 1- α	6 [4; 9] * +	12 [4;23] +	24 [17; 35] *	4 [3; 10] * +
IL 6	0,01 [0,01; 63] * +	0,04 [0,02; 75]	0,04 [0,01; 77]	0,025 [0,01; 0,06] +
IL 8	3 [2; 22] * +	7 [6; 27]	5 [4; 24]	8 [8; 9]
TGF- α	0,8 [0,3; 1,3] * +	1,4 [1,3; 2,9]	3,5 [2,2; 5,2] * +	0,6 [0,6; 1,3] * +
TNF- α	5 [3; 7] * +	20 [15; 28]	24 [23;39]	20 [22; 37]
VEGF	83 [82; 119] * +	145 [116; 160]	226 [152; 233] *	387 [116; 549] *
PDGF	387 [368; 422] * +	967 [534; 984] +	130 [91,8; 134] *	4110 [2769; 5369] * +
* - различия с БоТП достоверны (критерий Краскела-Уоллиса, $p < 0,05$)				
+ - различия с БедПл достоверны (критерий Краскела-Уоллиса, $p < 0,05$)				

В образцах БедПл уровень PDGF был в 3 раза ниже по сравнению с сывороткой, однако концентрация всех остальных факторов в лизатах БедПл достоверно превышала аналогичные значения для сыворотки. Между лизатами БоТП и БедПл главное различие наблюдалось по уровню PDGF и EGF – концентрация этих факторов в БоТП была выше в 7,4 раза и в 12,1 раз соответственно ($p < 0,05$). Концентрации FGF-2, IL 6, IL 8, TNF- α в БоТП и БедПл достоверно не различались. Лизаты тромбоцитов в БедПл также имели более высокую концентрацию факторов VEGF и TGF- α по сравнению с БоТП. В среднем, уровень VEGF и TGF- α в БедПл превышал аналогичные

значения для БоТП в 1,6 раз и 2,5 раз соответственно ($p < 0,05$). В лизатах ОтмТр концентрация большинства ростовых факторов была заметно выше, чем в лизатах БоТП: PDGF – в 4,2 раза, FGF-2 – в 3,1 раз, EGF – в 5,3 раз, VEGF – в 2,7 раз ($p < 0,05$). В то же время концентрация IL1 α снижалась в 3 раза, IL 6 – в 1,6 раз ($p < 0,05$). Таким образом, отмывание тромбоцитов от плазмы позволило заметно увеличить содержание ростовых факторов и одновременно с этим снизить содержание провоспалительных интерлейкинов в конечном тромбоцитарном лизате. В опытах со стабилизацией тромбоцитов наносеребром сохранность цитокинов в адгезирующих тромбоцитах зависела от концентрации наносеребра и типа фактора. Наибольшая сохранность VEGF и EGF отмечена при 1,25 мкМ наносеребра, FGF-2, TGF- α , PDGF – при 2,5-5,0 мкМ наносеребра.

Рост-стимулирующий эффект лизатов БоТП

В работе использовали тромбоцитарные лизаты на основе БоТП, БедПл, АктБоТП и ОтмТр. Конечная концентрация PDGF в опытах с БоТП составила от 5 до 250 пг/мл, в опытах с БедПл – от 0,5 до 25 пг/мл, в опытах с ОтмТр – от 17 до 900 пг/мл, в опытах с АктБоТП – от 1,5 до 85 пг/мл. В опытах с БоТП наибольший рост-стимулирующий эффект в культуре М-22 наблюдался при 20 мкл БоТП, дозы БоТП объемом 100 мкл БоТП (50 пг/мл PDGF) и выше вызывали заметное угнетение роста клеток и снижение их численности по сравнению с контролем. При добавлении АктБоТП максимальный стимулирующий рост эффект отмечен при дозе 500 мкл (концентрация PDGF 30 пг/мл). При введении в культуру БедПл с низкими концентрациями PDGF был также отмечен рост-стимулирующий дозозависимый эффект, аналогичный действию БоТП, при 200 мкл (12 пг/мл PDGF) и более число клеток в культуре снижалось. В опытах с использованием ОтмТр стимуляция роста выявлена во всех лунках вне зависимости от концентрации PDGF. В опытах с использованием тромбоцитов, отмывых от плазмы, стимуляция роста выявлена во всех лунках вне зависимости от концентрации PDGF, в опытах с АктБоТП

наблюдалась дозозависимая стимуляция роста. Стоит особенно подчеркнуть, что при анализе цитокинового состава препаратов была выявлена обратная корреляция между концентрацией провоспалительных цитокинов и общим количеством фибробластов в культуре через 3 суток. Значение коэффициента корреляции r составило: $-0,460$ ($p=0,004$) для IL1- α ; $-0,445$ ($p=0,006$) для IL6; $-0,411$ ($p=0,01$) для IL8. Также выявлена обратная корреляция между числом клеток и уровнем TGF- α ($r=-0,431$, $p=0,008$). Таким образом, большие концентрации провоспалительных цитокинов в составе тромбоцитных препаратов могут ингибировать рост клеток.

Рост-стимулирующие свойства тромбоцитов человека, стабилизированных наночастицами серебра

На 1-3 сутки культивирования во всех случаях основная часть ММСК адгезировала за пределами коллагенового матрикса. Через 3 суток на контрольных повязках (без тромбоцитов) содержание ММСК составило в среднем $6,5 \pm 1,1$ тыс/см². В опытах без стабилизации тромбоцитов в диапазоне от 40 до 120 млн тромбоцитов с гранулами на 100 тыс. высеянных ММСК общее количество клеток через 3 суток составляло 9,2-10,6 тыс/см². В среднем, использование 40-120 млн. нестабилизированных тромбоцитов с гранулами увеличивало пролиферативную активность ММСК в 1,5 раза (рис. 7б). При стабилизации тромбоцитов с гранулами в диапазоне от 20 до 120 млн на 100 тысяч ММСК рост-стимулирующий эффект заметно усиливался (рис. 7в). При этом в условиях предварительной инкубации тромбоцитов с 2,5 мкМ наночастиц серебра максимальный рост пролиферативной активности ММСК был отмечен при концентрации 61-80 млн тромбоцитов с гранулами (в 2,6 раза по сравнению с контролем). В то же время при стабилизации адгезирующих тромбоцитов наиболее интенсивный рост ММСК наблюдали при содержании тромбоцитов с гранулами 101-120 млн (в 2,5 раза по сравнению с контролем). При 130-170 млн тромбоцитов с гранулами рост-стимулирующий эффект заметно снижался при обоих способах стабилизации, а при 180-240 млн количество

ММСК было уже меньше, чем в контроле, т.е. данные концентрации оказывали ингибирующее действие на рост культуры. Максимальное подавление роста отмечено в опытах с 500-550 млн стабилизированных тромбоцитов, где число ММСК на повязках было в 3-4 раза снижено по сравнению с контролем. Методика насыщения повязок тромбоцитами, предварительно обработанными 2,5 мкМ наночастиц серебра, была признана наиболее удобной для длительных исследований.

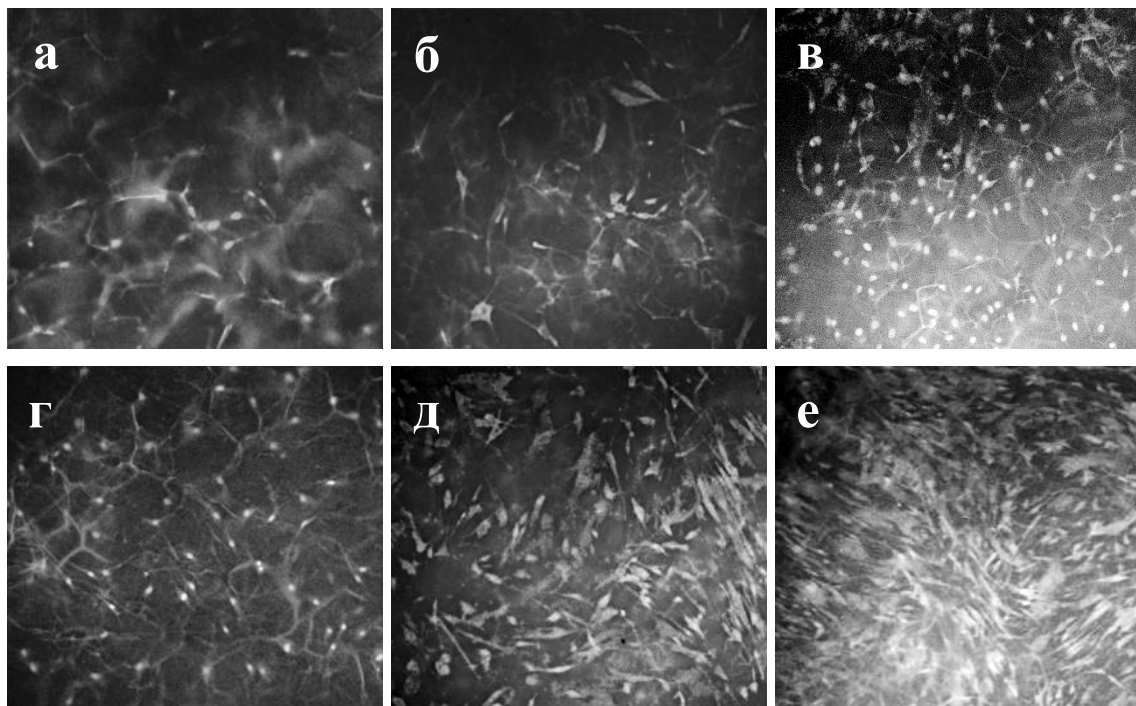


Рисунок 7 – Рост ММСК на коллагеновых повязках через 3 суток (верхний ряд) и 7 суток (нижний ряд) культивирования. Витальная окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение $\times 100$. а, г – контроль (повязка без тромбоцитов); б, д – повязка, содержащая 95 млн нативных тромбоцитов с гранулами; в, е – повязка, содержащая 95 млн тромбоцитов с гранулами, стабилизированных 5 мкМ наносеребра.

Через 7 суток в опытах с 90-100 млн стабилизированных тромбоцитов на поверхности коллагеновой повязки формировался выраженный конфлюэнтный монослой (рис. 7е), содержащий в среднем $24,1 \pm 0,5$ тысяч ММСК на см^2 , параллельно наблюдалась миграция клеток вглубь матрикса и на его противоположную сторону. Через 14 суток культивирования во всех опытах с 90-100 млн тромбоцитов образовывался конфлюэнтный (сплошной) монослой, содержащий 24-25 тысяч ММСК на 1 см^2 , без видимых

структурных повреждений клеток. Содержание ММСК на обратной стороне матрикса в опытах со стабилизированными тромбоцитами составило $6,0 \pm 0,2$ тыс/см², тогда в опытах без стабилизации – $1,6 \pm 0,1$ тыс/см².

Изучение репаративного эффекта тромбоцитов в эксперименте

Лечение экспериментального ожога

Через 3 суток у обследованных животных с ожогом IIIa степени местные признаки воспаления выявлялись слабо, отёчность окружающих мягких тканей отмечена лишь на небольших участках, гиперемия кожи вокруг раны отсутствовала. При гистологическом исследовании у всех животных на большей части раны эпителий был заметно поврежден или отсутствовал. В контрольной группе во многих участках дермы отмечено заметное изменение структуры волокон межклеточного матрикса (рис. 8А). У всех обследованных животных отмечена интенсивная инфильтрация дна раны и краевой части раны клетками воспаления. В опытных группах плотность инфильтрации была в 3-4 раза ниже чем в контроле ($p < 0,05$) повреждение волокон дермы было выражено слабее, чем в контроле, наблюдался рост краевого эпителия, а также рост эпителия из волосяных фолликулов (рис. 8Б,В). Активная миграция фибробластов отмечена в подлежащих слоях раны, аналогично тому, как это наблюдается при использовании аллогенных тромбоцитов [van der Vijl et al., 2019]. Через 5 суток в контрольной группе эпителизованная область раны была покрыта однослойным неэпителием, зоны формирования многослойного эпителия были незначительными (рис. 9А). Доля поврежденных волокон в дерме заметно снижалась, при этом многие волокна сохраняли отечность, особенно в глубоких слоях дермы. Инфильтрация клетками воспаления наблюдалась в основном в подлежащих слоях раны. В опытных группах эпителий на всех участках содержал не меньше 2-3 слоев клеток, продолжалась миграция эпителия из придатков кожи, отмечено формирование многослойного

эпителия (рис. 9Б,В). Вместе с тем, в ряде участков наблюдалось отделение эпителиального слоя от дермы, сохранялась инфильтрация клетками воспаления. Таким образом, стимуляция репаративных процессов в опытных группах на 5 сутки продолжалась, скорость восстановления тканей при использовании повязок с тромбоцитами была увеличена на фоне сохранения воспалительной реакции.

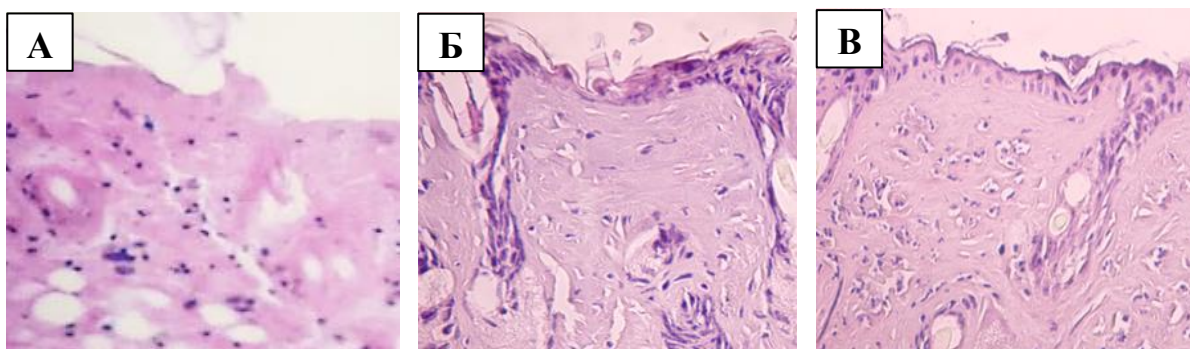


Рисунок 8 – Дно ожоговой раны IIIа степени через 3 суток эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. А – контроль (без тромбоцитов); Б – повязка с нестабилизированным тромбоцитами; В – повязка с тромбоцитами, стабилизированными 2,5 мкМ наночастиц серебра.

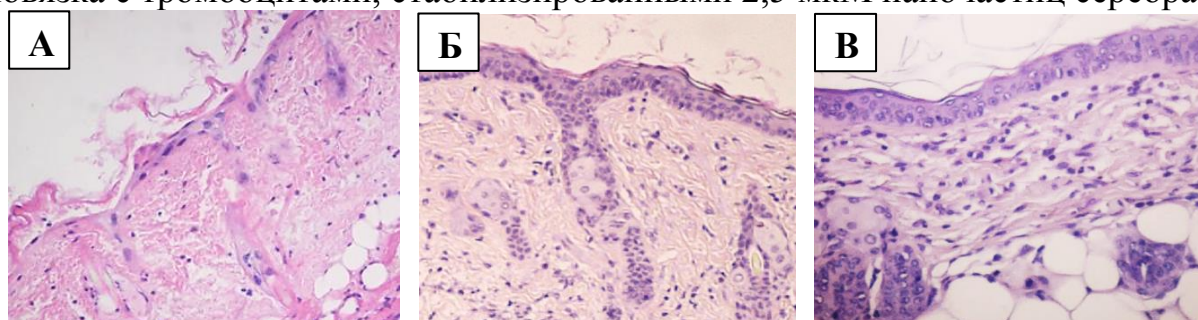


Рисунок 9 – Восстановление эпителия в ожоговой ране IIIа степени через 5 суток лечения коллагеновой повязкой. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 200$. А – контроль (без тромбоцитов); Б – повязка с нестабилизированным тромбоцитами; В – повязка с тромбоцитами, стабилизированными 2,5 мкМ наночастиц серебра.

Лечение глубокой механической раны

Через 3 суток у всех животных наблюдалась выраженная гиперемия и отечность раны. Дермальный матрикс (ДМ) был плотно зафиксирован к дну раны у всех животных. При гистологическом исследовании через 3 суток у всех животных контрольной и опытных групп на всей поверхности раны полностью отсутствовал эпителий и дермальный слой, наблюдалось формирование обширного струпа, включавшего раневое отделяемое и ДМ,

тесно ассоциированного с тканями дна раны (рис. 10А-В). Во всех случаях дно раны и подлежащие ткани были сильно инфильтрированы клетками воспаления. У животных обеих опытных групп по краям раны наблюдалась интенсивная миграция фибробластов в подлежащих слоях раны.

Через 14 суток у всех животных было отмечено формирование грануляционной ткани по всему дну раны (рис. 10Г-Е). Плотность новообразованных сосудов в контроле составила 171 ± 33 , в опытных группах – 504 ± 27 ($p < 0,05$), т.е. была увеличена почти в 3 раза. При этом во всех случаях сохранялась высокая инфильтрация дна раны клетками воспаления, плотность инфильтрации значимо не отличалась от 3 суток ($p > 0,05$). В грануляционной ткани клетки воспаления были представлены преимущественно сегментоядерными гранулоцитами. В обеих группах коллагеновые волокна были слабо компактизированными, уровень автофлуоресценции волокон был достоверно ниже нормы. Через 21 сутки в контрольной группе выявлялись обширные области, покрытые эпителием, однако эпителизация не была полной (рис. 10Ж). В областях, связанных со струпом, отмечен высокий уровень инфильтрации клетками воспаления, восстановления дериватов кожи в этих участках не наблюдалось. В обеих опытных группах вся область раны была покрыта эпителием, наблюдалось формирование многослойного эпителиального пласта (рис. 10З,И) и отделение струпа. По краям раны наблюдался интенсивный рост дериватов кожи. Инфильтрация раны клетками воспаления сохранялась, плотность инфильтрации была в 2-2,1 раза ниже, чем через 3-14 суток лечения ($p < 0,05$). Плотность новообразованных сосудов в области раны в обеих экспериментальных ранах снижалась в 2,5 раза по сравнению с 14 сутками ($p < 0,05$). В группе лечения ДМ со стабилизированными тромбоцитами плотность новообразованных сосудов была в 1,2 раза выше, чем при лечении ДМ с нестабилизированными тромбоцитами, однако это различие не было достоверным. Таким образом, полного восстановления дермы через 21 сутки в опытных группах не происходило на фоне сохранения воспалительной

реакции. С другой стороны, в опытных группах ремоделирование тканей в области раны шло более интенсивно по сравнению с контролем. Тромбоциты в составе коллагеновых матриц стимулируют ангиогенез в ранах, что подтверждает данные других авторов, которые применяли тромбоцитарные лизаты [Notodihardjo S.C. et al., 2018; Shahidi M. et al., 2018].

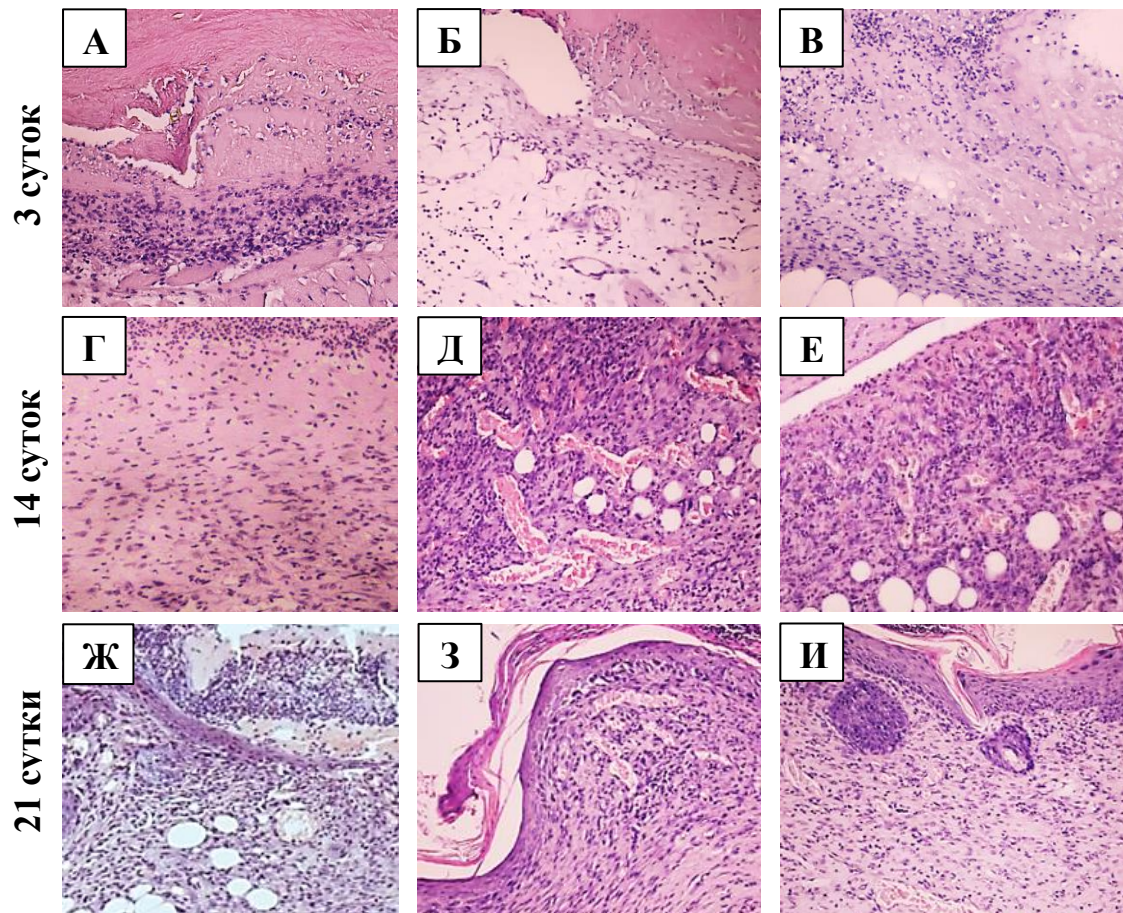


Рисунок 10 – Дно глубокой экспериментальной раны на разных этапах лечения. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение $\times 200$. А, Г, Ж – ДМ без тромбоцитов (контроль); Б, Д, З – ДМ с нестабилизированными тромбоцитами; В, Е, И – ДМ со стабилизированными тромбоцитами.

Можно заключить, что раневые покрытия на основе ДМ с тромбоцитами ускоряли миграцию клеток в ране, стимулировали рост эпителия и грануляционной ткани. При этом выбранные концентрации тромбоцитов с гранулами не обладали выраженным противовоспалительным действием. Для более точного сравнения эффекта стабилизированных и нестабилизированных тромбоцитов при лечении ран необходимо исследовать действие препаратов с разным содержанием тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что морфофункциональные параметры тромбоцитов играют критическую роль еще на этапе обследования доноров. Морфофункциональный анализ позволяет выявлять тромбоциты, склонные к быстрой и спонтанной активации, а также оценить характер активации тромбоцитов под действием неканонических индукторов. Разные способы неканонической активации тромбоцитов позволяют использовать биологическую активность тромбоцитов в разных формах. С другой стороны, в процессе исследования выявлена возможность стабилизации (закрепления) тромбоцитарных гранул в адгезирующих тромбоцитах без нарушения их структурной целостности и цитокинового состава гранул. Стабилизация адгезирующих тромбоцитов делает возможным селективно сохранять или выделять из тромбоцитов ростовые факторы определенного типа. В работе с лизатами тромбоцитов цитокиновый состав конечного препарата сильно зависит от способа получения суспензии тромбоцитов. Для стимуляции роста клеток *in vitro* с помощью тромбоцитов большое значение имеет подбор эффективной дозы, которая определяется как уровнем цитокинов, так и содержанием биологически полноценных тромбоцитов в исходной суспензии. Тромбоциты могут быть использованы для повышения репаративных и регенеративных свойств коллагеновых матриксов.

ВЫВОДЫ

1. В крови доноров морфофункциональный статус тромбоцитов имеет высокую вариабельность во всех гендерно-возрастных группах. У 10-12% здоровых людей тромбоциты обладают высокой чувствительностью к 0,5 мкМ АДФ. Среди тромбоцитов с гранулами выявляются 3 субпопуляции с разной интенсивностью формирования ламеллы. В крови доноров уровень тромбоцитов, склонных к быстрой дегрануляции без интенсивного образования ламеллоподий, составляет от 8 до 40% функционально полноценных тромбоцитов. Чувствительность

тромбоцитарного пула к 0,5 мкМ АДФ зависит от уровня тромбоцитов, склонных к быстрой дегрануляции.

2. Тромбоциты человека *in vitro* проявляют биологическую активность и дегранулируют под действием 25-40% ДМСО, гипотонии (0,075-0,11М хлорида натрия), редокс-потенциала среды -100 мВ и ниже, 400-600 мкМ перекиси водорода, 1-3 мМ аскорбиновой кислоты, 15-100 мкМ наночастиц серебра, при воздействии НИЛИ с $\lambda=408$ нм (УФ-свет) и $\lambda=637$ нм (красный свет) в течение 5 минут и выше.

3. Тромбоцитарные гранулы могут быть стабилизированы в адгезирующих тромбоцитах с помощью 1-5 мкМ наночастиц серебра, 0,1-0,5 мМ аскорбиновой кислоты, 30-75 мкМ перекиси водорода. Концентрации наносеребра 1,25-5,0 мкМ дозозависимо подавляют рост тромбоцитарной ламеллы и дегрануляцию без нарушения структурной целостности тромбоцитов. Стабилизация тромбоцитов с помощью 2,5-5,0 мкМ наносеребра позволяет сохранить в адгезирующих тромбоцитах не менее 50% от всего объема гранул без нарушения структурной целостности клеток. Для сохранения факторов FGF-2, TGF- α , PDGF в тромбоцитах наиболее эффективна концентрация 2,5 мкМ наносеребра, для сохранения EGF и VEGF – 1,25 мкМ наносеребра.

4. Факторы роста и дифференцировки могут быть получены в составе как богатой, так и бедной тромбоцитами плазмы. Присутствие лейкоцитов достоверно повышает уровень PDGF и IL8 и снижает концентрацию VEGF и TNF- α в лизате БоТП. Предварительное отмывание тромбоцитов от плазмы позволяет получить лизат, где содержание факторов роста увеличено в 2-5 раз, содержание провоспалительных факторов снижено в 3-6 раз по сравнению с лизатом БоТП. В тромбоцитарных лизатах выявлена достоверная прямая связь между уровнем EGF и PDGF ($r=0,801$), между уровнем VEGF и TNF- α ($r=0,757$).

5. БоТП, выделенная из консервированной крови, может быть использована для получения тромбофибриновых сгустков при 20-22°C. Тромбофибриновые сгустки, выделенные при 20-22°C, обладают более высокими рост-стимулирующими свойствами по сравнению со сгустками, выделенными при 37°C.

6. В культуре клеток высокие дозы лизата БоТП и БедПл вызывают угнетение пролиферативной активности клеток и снижение их структурной целостности. Отмывание тромбоцитов от плазмы позволяет увеличить положительный эффект биологического потенциала тромбоцитов *in vitro*. Насыщение коллагеновых матриксов тромбоцитными препаратами увеличивает пролиферативную и миграционную активность диплоидных клеток человека *in vitro* без нарушения их структурной целостности при условии выбора оптимальной концентрации препарата.

7. Стабилизация тромбоцитов наночастицами серебра повышает рост-стимулирующий эффект матриксов с тромбоцитами. При лечении экспериментальных ожоговых и глубоких механических ран у мышей в эксперименте коллагеновые матриксы, насыщенные тромбоцитами, ускоряют репаративные процессы в коже, стимулируют миграцию фибробластов, стимулируют рост сосудов и эпителизацию, ускоряют восстановление дериватов кожи. Динамика восстановления кожи при использовании нативных и стабилизированных тромбоцитов была сходной.

Публикации по теме диссертации

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Макаров, М.С. Влияние центрифугирования на биологическую полноценность тромбоцитов человека / М.С Макаров, Н.В Боровкова, В.Б. Хватов и др. // **Вестник службы крови России**. –2015. –№ 1. –С. 41-44.
2. Макаров, М.С. Неканонические способы активации тромбоцитов человека / М.С. Макаров // **Медицинский алфавит**. –2015. –Т. 3, №11. –С. 30-35.
3. Макаров, М.С. Положительные и отрицательные стороны адгезивной активности тромбоцитов человека / М.С. Макаров // **Российский медицинский журнал**. –2015. –Т. 21, № 5. –С. 34-40.

4. Макаров, М.С. Применение богатой тромбоцитами плазмы для стимуляции заселения коллагеновых матриц фибробластами человека / М.С. Макаров // *Наука и мир.* –2015. –Т. 1, № 11(27). –С. 53-58.
5. Макаров, М.С. Роль богатой тромбоцитами плазмы в репарации дефектов костной ткани / М.С. Макаров, И.Н. Пономарев // *Хирургия. Журнал имени Н.И. Пирогова.* – 2015. –№10. – С. 94-99.
6. Макаров, М.С. Стабилизации тромбоцитов человека на адгезивном субстрате с помощью тикагрелора / М.С. Макаров, В.Б. Хватов, Н.В. Боровкова // *Молекулярная медицина.* –2015. –№ 6. –С. 57-60.
7. Makarov, M.S. Use of Platelet-Rich Plasma for Collagen Matrixes Revitalization with Human Fibroblast / M.S., Makarov, N.V. Borovkova, O.I. Konushko et al. // *Journal of Biosciences and Medicines.* –2015. –№3. –P. 80-87.
8. Макаров, М.С. Анализ морфофункционального статуса тромбоцитов у доноров разных групп: портрет «идеального» донора тромбоцитных концентратов / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин // *Трансфузиология.* –2016. –Т.17, №2. –С.14-26.
9. Макаров, М.С. Влияние высоких концентраций диметилсульфоксида на биологическую активность тромбоцитов человека в плазме / М.С. Макаров // *Медицинский Алфавит. Современная Лаборатория.* –2016. –№2. –С. 48-52.
10. Макаров, М.С. Эффективность комбинации аллогенной богатой тромбоцитами плазмы с коллагеном при лечении дефектов бедренной кости у крыс /А.Ю. Ваза, В.В. Сластинин, Н.В. Боровкова и др. // *Трансплантология.* –2016. –№2. –С.36-44.
11. Макаров, М.С. Стимуляция регенераторных процессов в хронических ранах с помощью богатой тромбоцитами плазмы / В.Н. Оболенский, Д.А. Ермолова, М.С. Макаров и др. // *Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского.* –2016. –№ 1. –С.38-43.
12. Макаров, М.С. Исследование биологической совместимости пленок и нетканых мембран из сополимера 3-гидроксимасляной и 4-гидроксимасляной кислот в культуре клеток *in vitro* / Н.В. Боровкова, А.К. Евсеев, И.В. Горончаровская, М.С. Макаров, О.Н. Виноградова, Е.Д. Николаева, Д.Б. Гончаров // *Журнал Сибирского федерального университета. Серия «Биология».* –2016. –Т.9, №1. –С. 43-52.
13. Макаров, М.С. Электрохимическая оценка жизнеспособности тромбоцитов / А.Ю. Цивадзе, М.Ш. Хубутия, И.В. Горончаровская и др. // *ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК. Физическая химия.* –2016. –Т. 471, № 1. –С. 58–61.
14. Макаров, М.С. Значение автофлюоресценции коллагеновых волокон для оценки биологических свойств тканевых трансплантатов / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова // *Современные технологии в медицине.* –2017. –Т.9, №2. –С. 83–90.
15. Макаров, М.С. Актуальные аспекты подготовки тромбоцитов человека к использованию в регенеративной медицине / М.С. Макаров // *Медицинский алфавит. Современная лаборатория.* –2017. –Т.4, № 28. –С. 46-51
16. Макаров, М.С. Влияние наночастиц на биологическую полноценность тромбоцитов человека / М.С. Макаров // *Молекулярная медицина.* –2017. –Т. 15, №6, –С. 9-14.
17. Макаров, М.С. Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека в условиях контакта с наночастицами серебра / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, М.В. Сторожева // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* –2017. –№ 3. –С.148-154
18. Макаров, М.С. Ростстимулирующие свойства тромбоцитов человека, стабилизированных наночастицами серебра / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, М.В. Сторожева и др. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* –2018. –Т.166, №8. –С. 221-225.
19. Макаров, М.С. Физиологическое и прогностическое значение тромбоцитов без гранул / М.С. Макаров // *Медицинский алфавит.* –2018. –№26(363).–Сер.: Современная лаборатория. –2018. –Т.3. –С. 32-37.

20. Макаров, М.С. Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека, подверженных *in situ* низкоинтенсивному лазерному облучению / М.С. Макаров, В.Б. Хватов // **Лазерная медицина**. –2019. –№ 2. –С.26-31.

21. Макаров, М.С. Перспективы использования тромбоцитов человека в лечении дефектов костной ткани / М.С. Макаров // **Наука и мир**. –2019. –№ 2(66). –С. 62-66.

22. Макаров, М.С. Оценка взаимодействия материалов на основе магния с клетками крови и культурой диплоидных клеток человека *in vitro* / Н.В. Боровкова, С.В. Добаткин, М.С. Макаров и др. // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. –2019. –№3. –С. 195-202.

23. Макаров, М.С. Интенсивность роста ламеллы как характеристика морфофункционального статуса тромбоцитов человека / М.С. Макаров // **Медицинский алфавит. Современная лаборатория**. –2020. –Т. 1, № 5. –С. 30-33.

24. Макаров, М.С. Экспериментальное исследование влияния биологических покрытий со стабилизированными или нестабилизированными тромбоцитами на репаративный процесс в ране, эквивалентной глубокому ожогу / Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, И.Н. Пономарев и др.// **Клеточные технологии в биологии и медицине**. –2020. –№3. –С. 170-177.

25. Makarov, M.S. Morphofunctional Properties of Human Platelets, Treated with Low Doses of Hydrogen Peroxide / M.S. Makarov, M.V. Storozheva // **Journal of Biosciences and Medicines**. –2020. –Vol.8, № 9. –P. 125-130.

26. Макаров, М.С. Оценка цитокинового состава сыворотки крови и препаратов на основе тромбоцитов человека / Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, Ю.В. Андреев и др. // **Молекулярная медицина**. –2021. –Т. 19, № 3. –С. 51-57.

27. Макаров, М.С. Особенности раневого процесса при лечении поверхностных ожогов с помощью коллагеновых раневых покрытий, насыщенных тромбоцитами (экспериментальное исследование)/ И.Н. Пономарев, М.С. Макаров, Н.В. Боровкова и др.// **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. –2021. –Т.62, №2. –С.85-93.

28. Макаров, М.С. Регуляция адгезивной активности тромбоцитов человека с помощью аскорбиновой кислоты/ М.С. Макаров, М.В. Сторожева// **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. –2022. –Т. 174, № 8. –С. 253-256.

29. Макаров, М.С. Ростстимулирующий эффект тромбоцитарных препаратов, полученных разными способами, в культуре фибробластов человека / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. –2022. –№3. –С. 183-188.

30. Макаров, М.С. Морфофункциональные особенности веретенovidных тромбоцитов / М.С. Макаров // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. –2022. –Т. 174, №11. –С. 646-649.

31. Макаров, М.С. Биологическая полноценность и клиническая эффективность криоконсервированных тромбоцитов человека / М.С. Макаров, И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // **Достижения современной науки–медицине Подмоскoвья: междисциплинар. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов**. – Москва, 2015. –С. 24-25.

32. Макаров, М.С. Имобилизация тромбоцитов человека на адгезивных субстратах с помощью тикагрелора / М.С. Макаров, В.Б. Хватов, Н.В. Боровкова // **Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VII-го моск. междунар. конгр., г. Москва, 17-20 марта 2015г.** – М., 2015. –Ч.1. –С.243-245.

33. Макаров, М.С. Технология производства бесклеточного матрикса дермы для клинического применения / Ю.В. Андреев, И.Н. Пономарев, М.С. Макаров и др. // **Московская трансплантология: трансплантация органов. Инфекционные осложнения: материалы 6-й науч.-практ. конф. с междунар. участием, г. Москва, 5 июня 2015.** – М.: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2015. –С.3-4. – (Труды ин-та, Т.233).

34. Макаров, М.С. Физиологические и патофизиологические свойства микрочастиц тромбоцитов человека / М.С. Макаров // Science XXI century Proceedings of materials the international scientific conference: Czech Republic, Karlovy Vary - Russia, Moscow, 30-31 July 2015 -Karlovy Vary: Skleněný Můstek - Kirov: MCNIP, 2015. –С. 702-708.

35. Макаров, М.С. Влияние наночастиц серебра на морфофункциональный статус тромбоцитов человека / М.С. Макаров // Тромбоз. Гемостаз. Реология. –2016. –№3. –Прил. 1: –С.267-268.

36. Макаров, М.С. Влияние технологии инактивации патогенов на качество клеток тромбоцитарных концентратов / М.С. Макаров, И.В. Высочин, Е.Н. Кобзева // Вестник гематологии. –2016. –Т.12, №4. –С.32-33.

37. Макаров М.С. Значение анализа морфофункционального статуса тромбоцитов в неотложной медицине / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, В.Б. Хватов // Материалы Всерос. конф., 3-го съезда врачей неотложной медицины, (Москва, 6-7 октября 2016г.). – Москва: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2016. –(Труды ин-та, Т.237). –С.125.

38. Макаров, М.С. Перспективы использования наночастиц для стимуляции остеогенеза при лечении дефектов кости / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова // Материалы Всерос. конф., 3-го съезда врачей неотложной медицины, г. Москва, 6-7 октября 2016 г. – М.: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2016. – (Труды ин-та, Т.237). –С.50-51.

39. Макаров, М.С. Стимуляция остеогенеза комбинацией аллогенных коллагена и богатой тромбоцитами плазмы в эксперименте / А.Ю. Ваза, В.В. Сластинин, Н.В. Боровкова и др. // Новые технологии в скорой и неотложной медицинской помощи: материалы науч.-практ. конф., (Суздаль, 21-22 апреля 2016г.). – Москва: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2016. –(Труды ин-та, Т.236). –С.40-41.

40. Макаров, М.С.. Стимуляция регенераторных процессов в хронических ранах с помощью богатой тромбоцитами аутоплазмы (тромбоцитарных факторов роста). Экспериментальное и клиническое исследование / В.Н. Оболенский, Д.А. Ермолова, М.С. Макаров и др. // Реконструктивные и пластические операции в хирургии ран у детей и взрослых: тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., г. Москва, 16-17 мая 2016 г. –М., 2016. –С.74-76.

41. Макаров, М.С. Мониторинг морфофункционального статуса тромбоцитов человека в условиях окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода / М.С. Макаров // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. –2017. –Т. 3, №26. –С.38-39.

42. Макаров, М.С. Использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга от трупных доноров органов и (или) тканей для тестирования биотрансплантатов, применяемых в неотложной медицине / И.Н. Пономарев, М.С. Макаров, М.В. Сторожева // Материалы 1-й научно-практической конференции молодых специалистов учреждений здравоохранения ДЗ г. Москвы (г. Москва, 19 апр.2018 г.). – Москв.: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2018. –(Труды ин-та, Т.239). –С.72-73.

43. Макаров, М.С. Оптимизация методики приготовления тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов на основе дермального матрикса / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Материалы 4-го съезда врачей неотложной медицины с междунар. уч., (г. Москва, 19-20 октября 2018г.). – Москва: НПО ВМ: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2018. –С.80-81.

44. Макаров, М.С. Роль тканевых трансплантатов в практике НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского / И.Н. Пономарев, М.С. Макаров, М.В. Сторожева и др. // Материалы 4-го съезда врачей неотложной медицины с междунар. уч., (г. Москва, 19-20 октября 2018г.). – М.: НПО ВМ: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2018. –С.267-268.

45. Макаров, М.С. Способ приготовления тромбофибринового сгустка, обладающего рост-стимулирующими свойствами, для использования в неотложной и регенеративной медицине / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Материалы 4-го съезда врачей неотложной медицины с междунар. уч., (г. Москва, 19-20 октября 2018г.). – М.: НПО ВМ: НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, 2018. –С.262-263.

46. Макаров, М.С. Способы стабилизации секреторных гранул в составе тромбоцитов человека / М.С. Макаров // Биология – наука XXI века: сб. тезисов 22-ой Международ. Пушкинской школы-конференции молодых ученых, (Пушино, 23-27 апреля 2018г.). – Пушино, 2018. –С.355.

47. Макаров, М.С. Влияние лазерного облучения *in situ* на морфофункциональные свойства тромбоцитов человека / М.С. Макаров // Актуальные проблемы биомедицины – 2019: материалы XXV Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием (г. Санкт-Петербург, 28-29 марта 2019г.). – СПб., 2019. –С.136-138.

48. Макаров, М.С. Изменение морфофункционального статуса тромбоцитов человека в присутствии высоких концентраций аскорбиновой кислоты / М.С. Макаров // Биотехнология: состояние и перспективы развития: междунар. конгр., (г. Москва, 25-27 февраля 2019 г.). – М., 2019. –С.215-216.

49. Макаров, М.С. Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека в условиях высоких концентраций аскорбиновой кислоты / М.С. Макаров // Биология – наука XXI века: сб. тез. 23-й Международной Пушкинской школы – конференции молодых ученых, (Пушино, 15-19 апреля 2019г.). – Пушино, 2019. –С.299-300.

50. Макаров, М.С. Наночастицы серебра снижают секрецию ростовых факторов в адгезирующих тромбоцитах / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Гены и Клетки. –2019. –Т. 14 (прил.): МАТЕРИАЛЫ IV Национального конгресса по регенеративной медицине Москва, 20–23 ноября 2019 года. –С. 141.

51. Макаров, М.С. Определение эффективной концентрации богатой тромбоцитами плазмы для лечения травм опорно-двигательного аппарата / М.А. Малыгина, Н.В. Боровкова, А.М. Файн и др. // Съезд травматологов-ортопедов Сибирского федерального округа (Барнаул, 22-23 августа 2019 г.) – Санкт-Петербург: Альта Астра, 2019. –С.65.

52. Макаров, М.С. Регенерация кожи у мышей с ожогами в экспериментах с использованием тромбоцит-насыщенных раневых покрытий / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Материалы международной научно-практической конференции «Современные проблемы и перспективы исследований в анатомии и гистологии животных», Витебск, 3 октября - 1 ноября 2019 года, –С. 126-129.

53. Макаров, М.С. Содержание репаративных факторов в бедной и богатой тромбоцитами плазме / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Гены и Клетки. –2019. –Т. 14 (прил.): МАТЕРИАЛЫ IV Национального конгресса по регенеративной медицине, Москва, 20–23 ноября 2019 года, –С. 141.

54. Макаров, М.С. Факторы, инициирующие образование ламеллы у тромбоцитов человека / М.С. Макаров // Биологическая подвижность: материалы XII Всерос. симпозиума с междунар. участием, посвящ. памяти проф. З.А. Поддубной. – Пушино, 2019. –С.160-162.

55. Макаров, М.С. Цитокиновый состав как характеристика, определяющая регенеративный потенциал лизата богатой тромбоцитами плазмы / Н.В. Боровкова, И.Н. Пономарев, М.С. Макаров и др. // Трансфузиология. –2019. –Т.20, №2. –С.6-7.

56. Макаров, М.С. Цитокиновый состав как определяющий фактор противовоспалительного и регенеративного действия препаратов на основе тромбоцитов/ Н.В. Боровкова, М.А. Малыгина, И.Н. Пономарев и др. // Избранные вопросы травматологии и ортопедии: материалы Пироговского форума травматологов-ортопедов с междунар. уч. (Москва, 24-25 октября 2019г.). – М., 2019. –С.97-98.

57. Макаров, М.С. Эффект применения раневых покрытий, насыщенных тромбоцитами, при лечении глубоких ран в эксперименте / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Гены и Клетки. –2019. –Т. 14 (прил.): МАТЕРИАЛЫ IV Национального конгресса по регенеративной медицине, Москва, 20–23 ноября 2019 года –С. 140-141.

58. Makarov, M.S. Nanosilver induce platelet pro-thrombotic ability in norm and pathology / M.S. Makarov, V.S. Borisov, N.V. Borovkova et al. // Hamostaseologie. –2019. –Vol. 39,

Suppl. 1: Abstr. 63th Annual Meeting Society Thrombosis Haemostasis Research, (Berlin, 27 February - 2 March 2019.). –P. 11.

59. Макаров, М.С. Рост тромбоцитарной ламеллы как маркер гиперактивации тромбоцитов / М.С. Макаров // Лабораторная служба. –2020. –Т.9, №1. –С.43.

60. Макаров, М.С. Стимуляция активности тромбоцитов человека с помощью наночастиц серебра / М.С. Макаров // Сборник тезисов 24-ой Международной Пуцинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» – Пуцино, 2020. –С. 239.

61. Макаров, М.С. Способы получения тромбофибринового сгустка с рост-стимулирующими свойствами / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, М.В. Сторожева, И.Н. Пономарев // Сборник материалов 9-й научно-практической конференции с международным участием «Московская трансплантология. Задачи сегодняшнего дня», Москва, 10 июня 2021 года. –С.51-52.

62. Макаров, М.С. Рост тромбоцитарной ламеллы как маркер гиперактивности тромбоцитов /М.С. Макаров// Материалы 4-й науч.-практ. конф. молодых специалистов мед. организаций департамента здравоохранения г. Москвы (Москва, 16 апреля 2021г.). – Москва: НИИ СП им. Н. В. Склифосовского, 2021. –(Труды института, Т. 246).–С. 79-80.

63. Makarov, M.S. Reparation of experimental deep wound, treated with platelet-filled dermal matrix / N.V. Borovkova, Yu.V. Andreev, M.S. Makarov et al.// Journal of trauma and critical care.- 2022.- Vol.06: 5th International conference on Wound care, tissue and regenerative medicine (Paris, France, 15-16 April 2022). –P.67.

64. Макаров, М.С. Качественный состав БОТП при разных режимах центрифугирования / К.И. Бурыкин, М.В. Паршиков, Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, Пономарев И.Н. // Материалы III Конгресса ОРТОБИОЛОГИЯ 2022 «От исследования к клинической практике», Москва, 15-16 апреля 2022 г. –С. 160-162.

65. Макаров, М.С. Влияние разных доз тикагрелора на активность тромбоцитов человека *in vitro* / М.С. Макаров // Гематология и трансфузиология. –Т. 67, №2. –С. 247.

66. Макаров, М.С. Способ приготовления тромбофибринового сгустка, обладающего ростстимулирующими свойствами / М.С Макаров, М.В. Сторожева, Н.В. Боровкова и др. // Патент РФ на изобретение № 2679616. Оpubл. 12.02.2019. –Бюл. №5.

67. Макаров, М.С. Способ получения богатой тромбоцитами плазмы и способ получения тромбофибринового геля или сгустка с сывороткой, содержащие факторы роста, из нестабилизированной венозной крови / Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, И.Н. Пономарев и др. // Патент РФ на изобретение № 2717448. Оpubл. 23.03.2020. –Бюл. № 9.

68. Макаров, М.С. Способ приготовления лизата тромбоцитов с высоким содержанием факторов роста / Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, М.В. Сторожева и др. // Патент РФ на изобретение № 2739515. Оpubл. 25.12.2020. –Бюл. № 36.

69. Макаров, М.С. Выбор и изготовление тромбоцитных препаратов для использования в регенеративной медицине. Метод. рекомендации №23 / Н.В. Боровкова, М.С. Макаров, И.Н. Пономарев и др. // ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». – М., 2022. –26 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААТ – адгезивная активность тромбоцитов

АДФ – аденозиндифосфат

АктБоТП – активированная богатая тромбоцитами плазма

АсК – аскорбиновая кислота

БедПл – бедная тромбоцитами плазма

БоТП – богатая тромбоцитами плазма

ДМ – дермальный матрикс

ДМСО – диметилсульфоксид

КЧадф – коэффициент чувствительности тромбоцитов к АДФ

ЛейкБоТП – богатая тромбоцитами плазма с высоким содержанием лейкоцитов

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

МФАТ – морфофункциональная активность тромбоцитов

МФСТ – морфофункциональный статус тромбоцитов

НИЛИ – низкоимпульсное лазерное излучение

ОтмТр – тромбоциты, отмытые от плазмы

Стр.гр. – содержание тромбоцитов с гранулами в тыс/мкл

Сх_{гр} – сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах

ТФ – тромбофибриновый сгусток

УФ – ультрафиолетовый свет

Яцит – яркость цитоплазмы дисковидных тромбоцитов

Дтр.гр. – содержание тромбоцитов с гранулами в %