

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ГОРОДА МОСКВЫ  
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СКОРОЙ ПОМОЩИ  
ИМЕНИ Н.В. СКЛИФOSОВСКОГО  
ДЕПАРТАМЕНТА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ»

на правах рукописи

Макаров Максим Сергеевич

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕАЛИЗАЦИИ РЕГЕНЕРАТИВНОГО  
ПОТЕНЦИАЛА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

1.5.22 – клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

профессор, доктор медицинских наук

Хватов Валерий Борисович

Москва – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	19
1.1 Морфофункциональные особенности тромбоцитов.....	»
1.2 Неканонические способы активации тромбоцитов.....	25
1.3 Способы стабилизации тромбоцитов на ранних этапах активации...	35
1.4 Исследование биологического потенциала тромбоцитов в эксперименте.....	39
1.4.1 Исследования в культуре клеток.....	40
1.4.2 Исследования <i>in vivo</i> в эксперименте и в клинической практике.....	44
1.5 Получение инъекционных тромбоцитных препаратов.....	51
1.6 Получение аппликативных тромбоцитных препаратов.....	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	60
2.1 Объекты исследования.....	»
2.1.1 Исследование тромбоцитов <i>in vitro</i> .....	»
2.1.2 Исследование тканевых трансплантатов.....	61
2.1.3 Исследования в культуре диплоидных клеток человека.....	62
2.1.4 Исследования на экспериментальных животных <i>in vivo</i> .....	»
2.2 Работа с тромбоцитами и компонентами крови.....	64
2.2.1 Получение тромбоцитных препаратов.....	»
2.2.2. Исследование биологической активности тромбоцитов.....	67
2.2.2.1 Изучение чувствительности тромбоцитов к АДФ.....	»
2.2.2.2 Исследование ламеллообразования у тромбоцитов.....	»
2.2.2.3 Исследование действия диметилсульфоксида.....	68
2.2.2.4 Исследование тромбоцитов при разной тоничности раствора....	»
2.2.2.5 Изучение влияния низкоимпульсного лазерного излучения на тромбоциты.....	69

2.2.2.6 Активация тромбоцитов адреналином.....	»
2.2.3 Стабилизация гранул тромбоцитов.....	70
2.2.4 Получение насыщенных тромбоцитами коллагеновых матриц для оценки рост-стимулирующего действия тромбоцитных компонентов в культуре клеток.....	73
2.2.4.1 Коллагеновые матрицы с актБоТП и лизатом БоТП .....	74
2.2.4.2 Повязки со стабилизированными и нестабилизированными тромбоцитами.....	»
2.2.5 Получение раневых покрытий с тромбоцитами при исследовании репаративного действия БоТП in vivo.....	75
2.3 Макроскопическая оценка раны в исследовании на животных.....	76
2.4 Лабораторные методы исследования.....	77
2.4.1 Исследование тромбоцитов и их компонентов.....	»
2.4.2 Морфофункциональный анализ диплоидных клеток в культуре.....	80
2.4.3 Редоксиметрия.....	»
2.4.4 Оценка цитокинового состава тромбоцитных препаратов.....	81
2.4.5 Микроскопия.....	»
2.4.6 Гистологическое исследование.....	82
2.5 Статистический анализ.....	»
ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРОМБОЦИТОВ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТВЕТА.....	83
3.1 Характеристика морфофункционального статуса тромбоцитов в разных гендерно-возрастных группах.....	»
3.2 Морфофункциональный анализ роста ламеллы тромбоцитов.....	86
3.3 Морфофункциональные особенности тромбоцитов без гранул.....	90
ГЛАВА 4. СПОСОБЫ СТИМУЛЯЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТАНДАРТНЫХ ИНДУКТОРОВ АГРЕГАЦИИ.....	94

4.1 Влияние высоких концентраций диметилсульфоксида на биологическую активность тромбоцитов.....	»
4.2 Влияние тоничности раствора на активность тромбоцитов.....	102
4.3 Влияние редокс-потенциала среды на активность тромбоцитов.....	106
4.4 Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека, подверженных <i>in situ</i> низкоимпульсному лазерному облучению.....	107
<b>ГЛАВА 5. СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ СЕКРЕТОРНЫХ ВЕЗИКУЛ В СОСТАВЕ АДГЕЗИРУЮЩИХ ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА.....</b>	
<b>113</b>	
5.1 Стабилизация тромбоцитов человека на адгезивном субстрате с помощью тикагрелора.....	»
5.1.1. Влияние тикагрелора на адгезирующие тромбоциты.....	»
5.1.2 Влияние разных доз тикагрелора на формирование тромбоцитарной ламеллы.....	121
5.2 Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека в условиях контакта с наночастицами серебра.....	122
5.3 Стабилизация тромбоцитов с помощью перекиси водорода.....	131
5.3.1 Изменение морфофункционального статуса тромбоцитов человека под действием перекиси водорода.....	»
5.3.2 Возможность стабилизации тромбоцитов путем предварительной инкубации с низкими дозами перекиси водорода.....	134
5.4 Стабилизация тромбоцитов человека с помощью аскорбиновой кислоты.....	139
<b>ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО СОСТАВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА.....</b>	
<b>142</b>	
6.1 Анализ цитокинового состава тромбоцитных препаратов, приготовленных разными способами.....	»
6.2 Сохранность рост-стимулирующих факторов в составе стабилизированных тромбоцитов, адгезирующих на коллагене.....	149

6.3 Способ приготовления лизата тромбоцитов с высоким содержанием ростовых факторов .....	151
ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ТРОМБОФИБРИНОВОГО СГУСТКА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ.....	160
7.1 Получение тромбофибринового сгустка с ростовыми факторами из неконсервированной крови.....	»
7.2 Получение тромбофибринового сгустка, насыщенного факторами роста.....	164
7.3 Инкорпорирование тромбофибриновых сгустков с помощью микрокристаллической целлюлозы.....	173
Глава 8. РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИЕ, РЕПАРАТИВНЫЕ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА АППЛИКАТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO И IN VIVO.....	178
8.1 Рост-стимулирующий эффект лизатов БоТП, полученных разными способами.....	»
8.2 Анализ структуры коллагена в составе тканевых трансплантатов...	182
8.3 Взаимодействие диплоидных клеток с тканевыми трансплантатами, насыщенными активированной БоТП и лизатом БоТП.....	189
8.4 Рост-стимулирующие свойства тромбоцитов, стабилизированных наночастицами серебра.....	197
8.5 Изучение репаративного эффекта тромбоцитов в эксперименте....	202
8.5.1 Лечение экспериментального ожога.....	»
8.5.2 Лечение глубокой механической раны.....	208
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	221
ВЫВОДЫ.....	240
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	242
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	244

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ААТ – адгезивная активность тромбоцитов
- АДФ – аденозиндифосфат
- АМФ – аденозинмонофосфат
- АсК – аскорбиновая кислота
- БедПл – бедная тромбоцитами плазма
- БоТП – богатая тромбоцитами плазма
- ГДК – губчатая деминерализированная кость
- ДМ – дермальный матрикс
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ИП – индекс пролиферации
- ИС – интенсивность свечения
- КПК – количество прикрепившихся клеток
- КТ – концентрат тромбоцитов
- КЧ<sub>адф</sub> – коэффициент чувствительности тромбоцитов к АДФ
- ЛейкБоТП – богатая тромбоцитами плазма с высоким содержанием лейкоцитов
- МКЦ – микрокристаллическая целлюлоза
- ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
- МФАТ – морфофункциональная активность тромбоцитов
- МФСТ – морфофункциональный статус тромбоцитов
- НИЛИ – низкоимпульсное лазерное излучение
- ОтмТР – тромбоциты, отмытые от плазмы
- ПассПл – плазма с тромбоцитами, полученная путем пассивной седиментации
- РП – редокс-потенциал
- Стр.гр. – содержание тромбоцитов с гранулами в тыс/мкл.
- Схгр – сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах
- ТБГ – тромбоциты, богатые гранулами

ТМч – тромбоцитарные микрочастицы

ТФ – тромбофибриновый сгусток

УФ – ультрафиолет

ФКК – фибробласты кожи кадавера

ЦКМ – целостность клеточных мембран

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Яцит – яркость цитоплазмы дисковидных тромбоцитов

Дтр.гр. – содержание тромбоцитов с гранулами в %

EGF – эпидермальный фактор роста

IL – интерлейкин

FGF – фактор роста фибробластов

MFI<sub>кол</sub> – средняя интенсивность свечения коллагена

PDGF – тромбоцитарный фактор роста

TGF- $\alpha$  – трансформирующий фактор роста альфа

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей альфа

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования**

При многих патологиях критическое значение имеет стимуляция и регуляция репаративных процессов в ране, необходимых для восстановления нормальной структуры тканей [1, 18, 49, 203, 271]. 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 [26, 31, 149, 214, 221, 293]. Известны разные формы таких препаратов: изделия на основе культивированных клеток человека (биомедицинский клеточный продукт) [45, 58, 71, 77]; изделия на основе некультивированных клеток [90, 168]; кондиционная среда, насыщенная ростовыми факторами культивированных клеток (секретом) [76, 145, 211]; суспензия ростовых факторов, выделенных путем криодеструкции клеток (клеточный лизат) [25, 72, 86, 222]; клеточные компоненты, инкорпорированные внутрь твердых или гелеобразных матриксов [98, 126, 267]. Препараты на основе клеток могут быть дополнительно комбинированы с раневыми покрытиями или с биологическими конструкциями [128, 219, 286]. В настоящее время идет активный поиск эффективных препаратов в травматологии и ортопедии, комбустиологии, хирургии, стоматологии, спортивной медицине. 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 [154, 289]. 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 как в суспензии, так и на поверхности твердого матрикса, способность стимулировать полимеризацию фибрина с образованием гелеподобных структур *in vivo* и *in vitro* [36, 208]. Активация тромбоцитов сопровождается выбросом биологически активных веществ в растворенном виде и в составе цельных тромбоцитарных микрочастиц, которые также могут адгезировать на субстрате [194, 195]. При этом скорость и характер дегрануляции могут заметно отличаться при разных способах активации тромбоцита. Плазматическая мембрана тромбоцитов содержит большое число рецепторов к различным лигандам активации (коллаген, АДФ, адреналин, тромбин и др.), что позволяет индуцировать агрегацию и дегрануляцию тромбоцитов с разной степенью интенсивности [11, 160, 193, 197, 306]. Кроме того, тромбоциты могут быть активированы в обход лиганд-рецепторного пути, под действием как органических, так и неорганических соединений [125, 174, 214, 258], а также некоторых физических факторов [109, 150, 260]. В зависимости от особенностей фактора, скорость и характер функционального ответа тромбоцитов заметно различаются. Показано, что в тромбоцитах присутствует сложная система внутриклеточного сигналинга, элементы которой функционируют независимо друг от друга [101, 104, 112, 188, 225, 303]. Благодаря этому, тромбоциты могут адгезировать без активной дегрануляции, могут выбрасывать гранулы без контакта с субстратом или с другими тромбоцитами или могут сохранять гранулы уже в составе агрегатов. Показано, что тромбоцитарные гранулы обладают гетерогенностью по их химическому составу и по механизму их экзоцитоза [170, 244, 298]. 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 [201, 224, 233]. 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 [24-26, 86-88, 95]. Стоит отметить, что в составе БоТП тромбоцитарные компоненты изначально могут находиться как внутри тромбоцитов, так и за их пределами [184, 187, 269]. 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 [124, 165, 176, 184, 200, 217]. 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 [102, 207, 266]. 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 БоТП 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 [51, 94, 135, 261, 263, 304]. 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 [191, 273, 274]. 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 [37, 39], 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
6. Оценить рост-стимулирующие, репаративные и регенеративные свойства коллагеновых матриц 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 матриц 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 матриксов 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  $-100\text{мВ}$  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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Морфофункциональные особенности тромбоцитов

Тромбоциты человека представляют собой уникальные клетки, которые, при всей их высокой дифференцированности, играют значительную роль во многих биологических процессах. Помимо участия в системе гемостаза, тромбоциты выполняют ангиотрофическую, эндотелий-поддерживающую, транспортную, репаративную, рост-стимулирующую функции [89, 91, 224]. Такая полифункциональность тромбоцитов во многом обусловлена наличием в них большого количества биологически активных компонентов – в настоящее время известно свыше 300 типов таких веществ. Структурно полноценные тромбоциты содержат факторы активации гемостаза и фибринолитики, белки адгезии, факторы роста и дифференцировки, цитокины и хемокины, протеазы и их ингибиторы, антимикробные белки [154, 158, 195]. Все эти факторы содержатся в секреторных везикулах (гранулах) тромбоцитов. Выделяют 3 типа гранул: альфа-гранулы (наиболее богатые факторами), бета-гранулы (плотные гранулы) и гамма-гранулы (лизосомы). В условиях *in vivo* гранулы выходят за пределы тромбоцитов в процессе их активации, при этом содержимое тромбоцитарных гранул обладает множественным биологическим эффектом. Неоднократно показано, что тромбоцитарные компоненты могут вызывать развитие или усиление различных патофизиологических процессов, а также вызывать осложнения уже существующих патологий, препятствуя восстановлению поврежденных тканей (рис. 1). Таким образом, биологический потенциал тромбоцитов носит двойственный и даже противоречивый характер: с одной стороны, тромбоциты содержат большое число факторов репарации и регенерации, однако адекватная реализация этого потенциала требует сложного физиологического баланса. Этот баланс должен включать не только взаимодействие тромбоцитов и их факторов с клеточно-тканевым окружением,

но и взаимодействие между самими факторами; в противном случае биологический потенциал тромбоцитов теряет свою ценность или даже становится весьма вредным [192-195]. Следовательно, при решении задач регенеративной медицины, при создании биопрепаратов необходимо очень внимательно учитывать формы биологической активности тромбоцитов, особенно на начальных этапах, связанных с подготовкой тромбоцитов. Не вызывает сомнения, что для создания эффективных тромбоцитных препаратов критическое значение имеет качество исходных тромбоцитов, поэтому при работе с тромбоцитами человека очень важно знать их морфофункциональные характеристики.

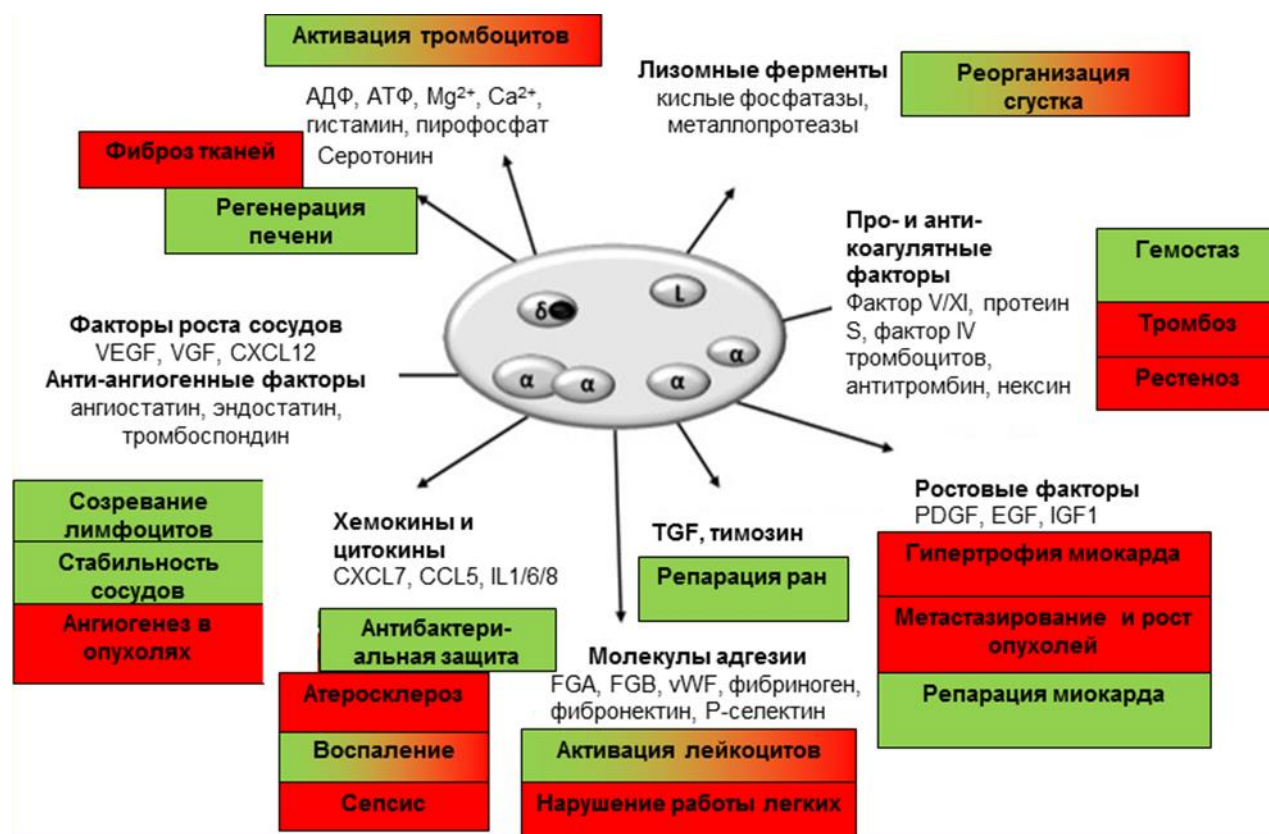


Рисунок 1 – Наиболее известные компоненты гранул тромбоцитов и их биологический эффект (по: Golebiewska, Poole, 2014 [154]; Lannan, 2015[195]).

Необходимо отметить, что содержимое гранул стимулирует как физиологические (зеленые поля) и так и патофизиологические (красные поля) реакции. Некоторые из реакций могут в разных условиях давать позитивный и негативный биологический эффект (двухцветные поля).

Морфология тромбоцитов человека изучена весьма подробно, поэтому некоторые схематические изображения тромбоцитов уже можно считать классическими (рис. 2А); в настоящее время ведутся работы по исследованию молекулярных структур, определяющих особенности строения и функций тромбоцитарных органелл, по исследованию систем внутриклеточного сигналинга [55, 112, 225]. Существуют трехмерные реконструкции тромбоцитов, полученные с помощью конфокальной микроскопии (рис. 2Б). Можно видеть, что значительную часть объема тромбоцита составляет канальцевая система, осуществляющая выброс гранул во время активации.

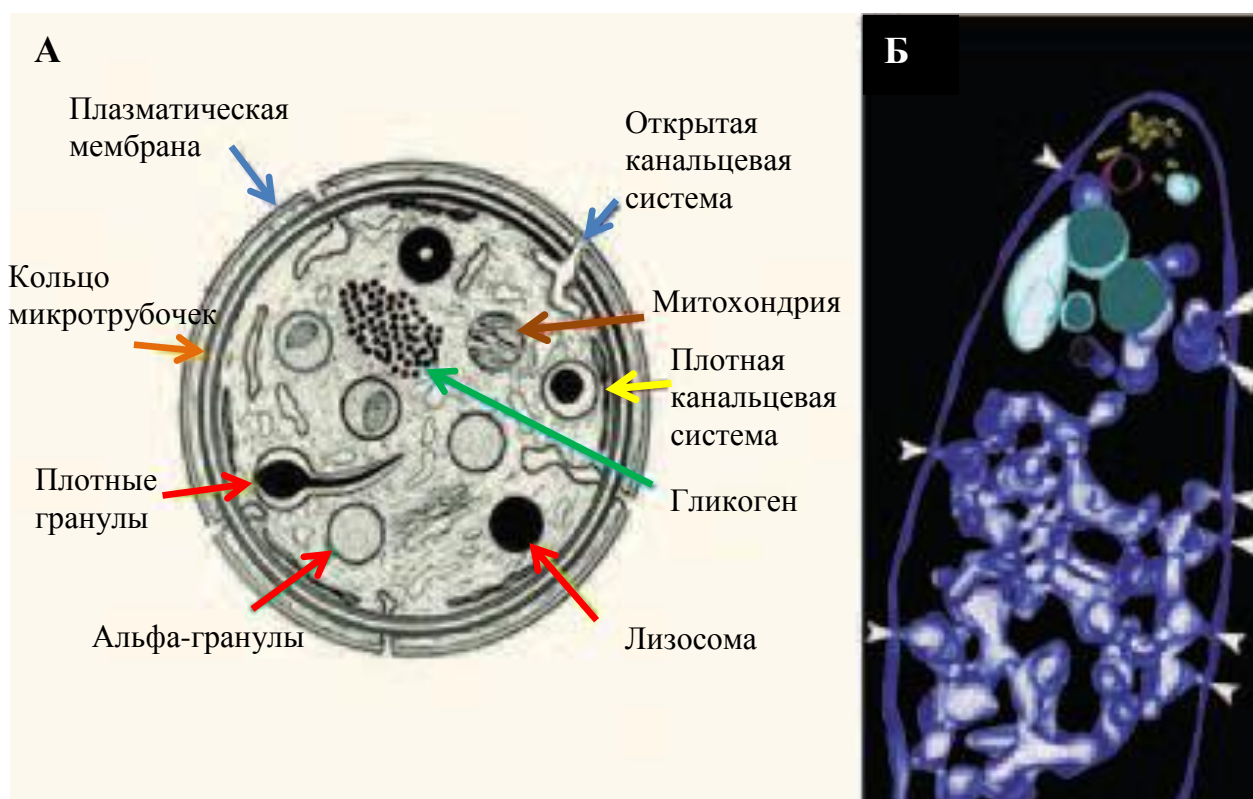


Рисунок 2 – Схематическое изображение структуры тромбоцита человека

А – классическая схема (по: White, 2004[305]; Пантелеев, Свешникова, 2014[55])

Б – 3-х мерная реконструкция тромбоцита (из: van Nispen tot Pannerden et al., 2010 [298]). Необходимо отметить обширную и сильно разветвленную открытую канальцевую систему (синий цвет), имеющую большое количество контактов с плазматической мембраной (показаны стрелками). Секреторные везикулы – альфа-гранулы (зеленый цвет) и плотные гранулы (красный цвет) на данной реконструкции занимают довольно небольшой объем от всей цитоплазмы, в реальных тромбоцитах количество гранул заметно выше.

Гранулы занимают чуть меньше трети от всего объема тромбоцита, при этом если плотные гранулы и лизосомы всегда имеют характерную округлую форму, то среди альфа-гранул можно выявить как округлые везикулы диаметром 200-600 нм, так и трубчатые, в виде узких вытянутых, часто изогнутых цилиндров диаметром 40-60 нм, суммарная длина которых превышает диаметр самого тромбоцита. Гранулы обоих типов содержат идентичное количество основных ростовых факторов, выделяемых тромбоцитами; с другой стороны, трубчатые гранулы обогащены  $\alpha 2\beta 3$ -рецепторами к коллагену, но почти не содержат фактора Виллебранда и фактора дифференцировки TGF- $\beta$  [178, 298]. Кроме того, уже среди самих сферических альфа-гранул отмечена неоднородность по их химическому составу и по механизму экзоцитоза. В частности, факторы, являющиеся антагонистами, находятся в разных альфа-гранулах. Это можно видеть на примере ангиогенного фактора VEGF и анти-ангиогенного фактора эндостатина (рис. 3). Также показано, что при активации тромбин-зависимых PAR4-рецепторов происходит выделение гранул, содержащих эндостатин, в то время как большая часть VEGF-содержащих гранул сохраняется внутри тромбоцита; напротив, активация PAR1-рецепторов стимулирует выделение VEGF без выделения эндостатин-содержащих гранул [170, 171]. Кроме того, в составе мембран всех альфа-гранул входят специфические белки группы VAMP (vesicle-associated membrane proteins), которые играют большую роль в экзоцитозе [244]. Так, гранулы с VAMP 7 экзоцитируются адгезирующими тромбоцитами в области растущей ламеллоподии (периферия клетки), а гранулы с VAMP 3/VAMP 8 – в области грануломера (центральная часть клетки), при этом плотность распределения гранул также различна (рис. 4). С другой стороны, в гранулах с разными VAMP-белками чаще всего наблюдается идентичный состав основных биологически активных веществ тромбоцитов, т.е. физиологический смысл наличия в тромбоцитах разных типов VAMP-белков еще предстоит выяснить.

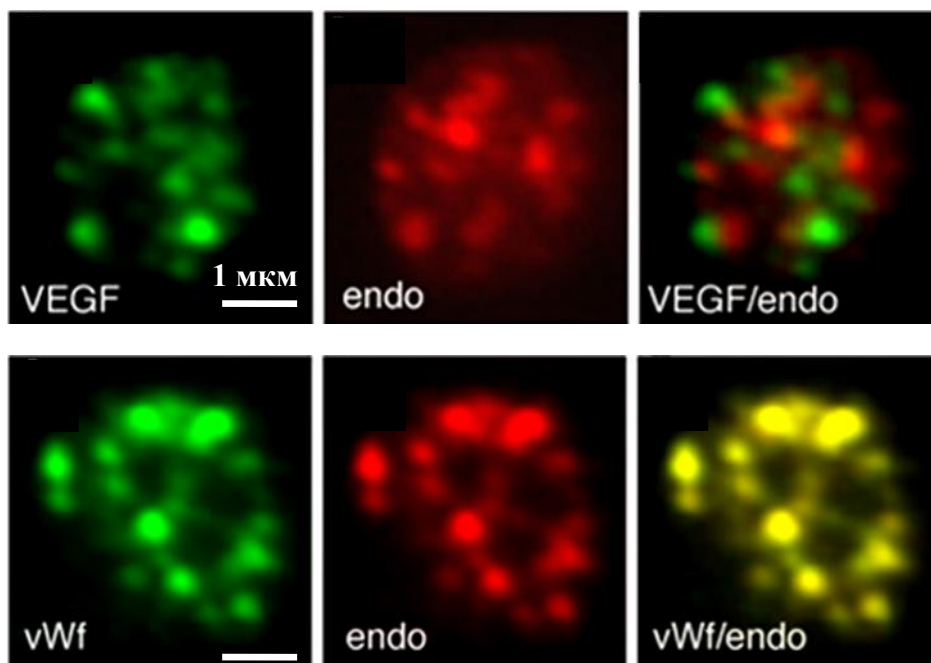


Рисунок 3 – Иммуногистохимическое выявление компонентов альфа-гранул. Из: Italiano et al., 2008 [170].

Первый ряд - окраска на VEGF и эндостатин (endo), нижний ряд – окраска на фактор Виллебранда (vWf) и эндостатин. При совмещении кадров можно видеть, что VEGF и эндостатин содержатся в разных гранулах, в то время как рисунок распределения эндостатина и vWf совпадает.

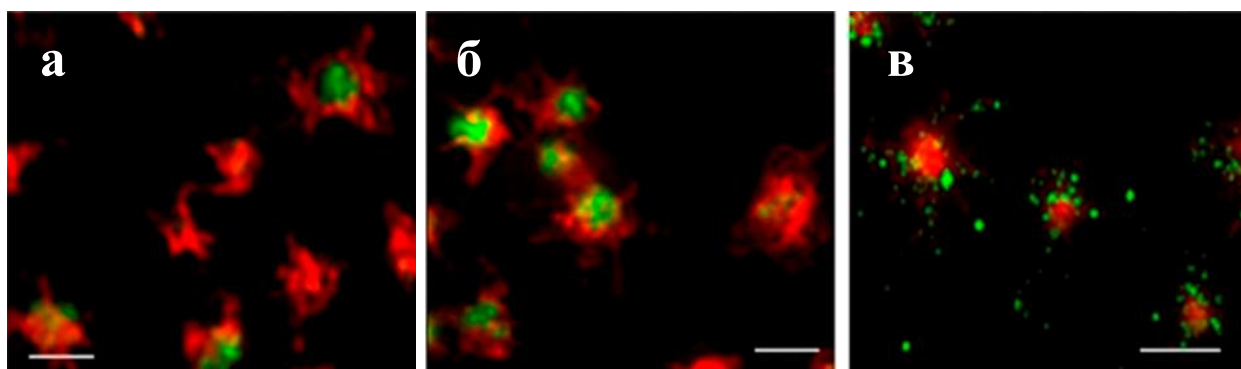


Рисунок 4 – Иммуногистохимическое выявление белков группы VAMP в тромбоцитах человека: VAMP 3(а), VAMP 8(б) и VAMP 7(в). Из: Peters, Michelson, Flaumenhaft, 2012 [244]. Масштабная линия 5 мкм.

Для выявления контуров тромбоцитов используется окраска меченым фаллоидином на F-актин (красное свечение). Гранулы, содержащие белки VAMP, имеют зеленое свечение, локализованное либо в центральной части клеток (а, б), либо по их периферии или уже выходит за пределы (в). Необходимо подчеркнуть, что не все тромбоциты содержат гранулы.

Гетерогенность альфа-гранул указывает на наличие различных, независимых друг от друга механизмов реализации их биологического потенциала, что, в частности, объясняет наличие у тромбоцитов человека большого числа путей активации: через коллаген (рецептор GP VI,  $\alpha 2\beta 1$ ), АДФ (пуринорецепторы P2Y1 и P2Y12), тромбин (PAR4/ PAR1), тромбоксан (TP $\alpha$ ), а также через серотонин, адреналин, ристоцетин [55, 209]. Часть тромбоцитарных компонентов секретируется в составе цельных везикул (микрочастиц). Тромбоцитарные микрочастицы (ТМч) имеют диаметр от 0,1 до 1 мкм, несут на себе маркеры CD31+CD41+/ CD42b+, характерные для плазматической мембраны тромбоцитов [131, 171]. Фракцию ТМч можно получить путем центрифугирования тромбоцитарной суспензии с ускорением 12 000-22 000 g [146, 191]. Как и тромбоциты, ТМч могут стимулировать многие процессы в организме, в том числе патологические. При большом количестве патологий на фоне выраженной воспалительной реакции в циркулирующей крови отмечается достоверный и весьма резкий рост содержания тромбоцитарных микрочастиц [187, 194, 291]. Наличие на поверхности ТМч рецепторов GP I $\alpha$  и GP IIb-IIIa позволяет им адгезировать на коллагене и фибрине [160, 231]. ТМч обладают гетерогенностью по фенотипу поверхностных маркеров – так, после выхода за пределы тромбоцита у части ТМч молекулы фосфотидилсерина остаются на внутренней стороне плазматической мембраны (в проточной цитометрии такие частицы отмечаются как аннексин-отрицательные), потому такие ТМч не несут маркеров апоптоза и могут циркулировать в крови намного дольше, чем аннексин-положительные ТМч (т.н. прокоагулянтные микрочастицы) [131]. ТМч активно участвуют в передаче межклеточных сигналов, основными получателями информации через ТМч в норме являются моноциты, макрофаги, клетки эндотелия, а также иммунокомпетентные клетки [106, 195, 222]. В качестве сигнальных молекул чаще всего выступают специфические белки (хемокины, ростовые факторы); в последнее время показано, что тромбоцитарные микрочастицы могут также содержать большое количество РНК, в первую очередь, микроРНК, действие которых связано с ингибированием



трансляции белков [135]. Кроме того, ТМч содержат, некоторые типы информационных РНК – в частности, РНК рецептора активации пролиферации пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR), осуществляющим контроль за гомеостазом жирных кислот в организме [53, 254]. Белки семейства PPAR стимулируют катаболизм избытка липидов, снижают уровень провоспалительных цитокинов, а также ингибируют их синтез в макрофагах, моноцитах и эндотелиальных клетках. Показано, что избыток ТМч в крови вызывает апоптоз лейкоцитов, эндотелия, а также клеток солидных органов. С другой стороны, ТМч также содержат информационные РНК, анти-апоптотического фактора NF-κB [222]. Таким образом, содержащиеся в ТМч РНК могут стимулировать принципиально противоположные процессы, и конечный эффект ТМч во многом зависит от соотношения этих факторов, которое, по всей видимости, носит выраженный индивидуальный характер. *In vitro* многократно показано, что ТМч стимулируют процессы ангиогенеза и нейрогенеза, способствуют росту выживаемости культивируемых клеток [184, 245, 247]. Поэтому ТМч потенциально тоже могут быть использованы при разработке тромбоцитных биопрепаратов.

## **1.2 Неканонические способы активации тромбоцитов**

*In vivo* и *in vitro* активация тромбоцитов обычно происходит под действием различных индукторов агрегации или их синтетических аналогов, а также при контакте тромбоцитов с адгезивными субстратами (коллаген, фибрин, искусственные полимеры, некоторые металлы). Эти способы активации тромбоцитов можно назвать каноническими. Однако, помимо канонических, существуют также неканонические способы активации тромбоцитов, которые стимулируют их агрегацию и дегрануляцию в отсутствие стандартных индукторов, без прямого запуска адгезии. Спектр известных неканонических факторов, способных активировать тромбоциты в суспензии, весьма велик и,

судя по всему, будет еще пополняться. Ниже представлены химические соединения и структуры, которые могут вызывать активацию тромбоцитов неканоническим способом.

### *Диметилсульфоксид*

Тромбоциты человека обладают весьма низкой способностью к самовосстановлению и легко повреждаются под действием самых разнообразных соединений, что создает повышенную трудность при их использовании в практических целях. Вместе с тем, при контакте с некоторыми веществами, в том числе токсичными, происходит активация тромбоцитов, сопровождающаяся выбросом гранул. Так, есть данные о том, что активирующее действие на тромбоциты могут оказывать соединения, повышающие проницаемость тромбоцитарных мембран – детергенты и ионофоры [256, 308], хотя детально механизм их действия не изучен. По всей вероятности, в присутствии детергентов или ионофоров происходит произвольный выход ионов кальция из кальциевых депо тромбоцита и последующий за этим каскад активации, приводящий к выбросу гранул. В связи с этим особенно интересна перспектива применения диметилсульфоксида (ДМСО), который используется в медицине в качестве трансдермального агента, облегчающего доставку в поврежденные ткани противовоспалительных, бактерицидных, обезболивающих и противоопухолевых препаратов [12, 15, 48, 83]. Считается, что лекарственные дозы ДМСО (10-50%) нормализуют микроциркуляцию крови и фибринообразование [162, 164], однако данные о влиянии ДМСО непосредственно на клетки крови остаются противоречивыми. В некоторых работах указано, что использование ДМСО препятствовало развитию кровотечений у лабораторных животных [164, 197], т.е. ДМСО оказывает некое активирующее влияние на тромбоциты, однако данных о морфофункциональном состоянии тромбоцитов в присутствии ДМСО в мировой литературе не представлено. В совместной работе с И.В. Высочиным мы установили, что в присутствии 5-6% ДМСО при комнатной температуре происходит постепенное

снижение биологической полноценности тромбоцитов, сопровождающееся, в том числе, разрушением гранул тромбоцитов без активации самих клеток. С другой стороны, в процессе разработки методик криоконсервирования тромбоцитов мы наблюдали, что под действием 5-20% ДМСО многие тромбоциты, изначально содержавшие гранулы, принимали вид, характерный для т.н. прокоагулянтных тромбоцитов. Отличительной чертой таких тромбоцитов является подчеркнута округлые или овальные очертания, наличие плотного участка цитоплазмы в виде узкого серпа или округлой «шляпки» («сар»), выраженная экспрессия Р-селектина и фосфатидилсерина на наружной мембране, а также способность связывать на своей поверхности большое количество факторов гемостаза, включая фибриноген, X, XI факторы [188, 247, 248]. Внутренняя морфология прокоагулянтных тромбоцитов является характерной для апоптотических клеток, но одновременно с этим прокоагулянтные тромбоциты представляют собой высокоактивированные клетки. Можно предположить, что при определенных условиях ДМСО будет стимулировать биологическую активность тромбоцитов.

### *Перекись водорода*

Перекись водорода ( $H_2O_2$ ) является наиболее стабильной из активных форм кислорода и потому может обладать наиболее выраженным и пролонгированным действием на клетки и их структуры. К настоящему моменту показана патогенетическая роль активных форм кислорода при более чем 100 различных заболеваниях, связанных в первую очередь с нарушениями сердечно-сосудистой системы [14, 65, 78]. В связи с этим вдвойне интересной представляется способность  $H_2O_2$  стимулировать активацию тромбоцитов. Показано, что в присутствии 600-2000 мкМ  $H_2O_2$  в БоТП *in vitro* формируются многочисленные небольшие (20-30 мкм) агрегаты тромбоцитов, образованные тесно связанными и необратимо активированными клетками, благодаря чему агрегат не диссоциирует с течением времени [34, 66]. Кроме того, 300 мкМ  $H_2O_2$  резко усиливает агрегацию тромбоцитов, вызванную малыми дозами индукторов

(0,5 мкМ АДФ, 0,5 мкМ серотонина, 1 мкМ тромбоксана), оказывая таким образом синергетическое стимулирующее действие [34]. Предварительное добавление в БоТП факторов, активно расщепляющих  $H_2O_2$  – например, супероксиддисмутаза – позволяет нейтрализовать активирующее действие перекиси на тромбоциты человека, а также снижает их адгезивную и агрегационную активность [42, 60]. Считается, что стимулирующее действие перекиси на тромбоциты связано с активацией систем внутриклеточного сигналинга (G-белки, циклооксигеназа, протеинкиназа C), а также с повышением внутриклеточной концентрации свободных ионов  $Ca^{2+}$ , что является важным фактором перестройки цитоскелета тромбоцитов с дальнейшей их активацией [35, 104, 106, 226]. Есть данные, что в низких дозах – до 50 мкМ – молекулы  $H_2O_2$  выполняют сигнальную роль и даже способны ингибировать активацию тромбоцитов под действием АДФ [8, 9]; во всяком случае, регуляция внутриклеточного содержания  $H_2O_2$  в тромбоцитах представляется особенно важной с точки зрения предотвращения их необоснованной активации. В покоящихся тромбоцитах нейтрализующие  $H_2O_2$  органеллы (пероксисомы) тесно ассоциированы с плотной канальцевой системой, главным источником внутриклеточного кальция [188], с целью недопущения активации  $Ca^{2+}$ -каналов под действием эндогенной перекиси. В условиях оксидативного стресса, когда продукция активных форм кислорода резко повышается, возможна спонтанная активация тромбоцитов с формированием многочисленных микроагрегатов. Этот эффект может наблюдаться у пациентов с острым коронарным синдромом, сахарным диабетом, у беременных женщин при гестозе [6, 14, 88, 143]. Напротив, наличие в среде активного ингибитора перекиси водорода приводит к тому, что биологически полноценные тромбоциты испытывают трудности с распластыванием на субстрате [8]. Следовательно, наличие  $H_2O_2$  в физиологических дозах необходимо для нормального функционирования тромбоцитов, а ее избыток способен стимулировать их активную агрегацию. Вместе с тем, всегда необходимо помнить о повреждающем действии активных форм кислорода на многие биологические структуры, в первую очередь – на

клеточные мембраны, поэтому использование  $H_2O_2$  для активации тромбоцитов в практических целях – например, при создании биотрансплантатов – имеет значительные ограничения.

### ***Тоничность среды***

В организме человека циркулирующие клетки крови находятся в изотоничной среде и испытывают изменение тоничности только при острых патологиях [59, 89, 68, 91]. Изотония – баланс между осмотическим давлением внутри клетки и давлением внешней среды, является одним из необходимых условий поддержания нормального клеточного гомеостаза. В условиях гипо- или гипертонии происходит изменение осмотического баланса, что может быть причиной гибели клеток как *in vitro*, так и *in vivo* [62, 129]. Вместе с тем, при различных физиологических процессах внутри отдельных клеточных компартментов происходит целенаправленное изменение тоничности, необходимое для выполнения специфических функций. Этот эффект наблюдается в экзосомах активно секретирующих клеток, которые перед выбросом увеличиваются в объеме, набухают за счет увеличения внутреннего транспорта воды. Набухание секреторных везикул является детерминированным процессом и осуществляется благодаря активности аквапоринов – трансмембранных белков, которые осуществляют активный транспорт молекул  $H_2O$ ,  $K^+$  и  $Cl^-$  [163, 287]. Считается, что набухание секреторных везикул необходимо для их слияния с т.н. поросомами – структурами на поверхности плазматической мембраны, которые осуществляют выброс содержимого гранул во внешнюю среду [287]. При этом набухание секреторных везикул фактически означает снижение тоничности их внутреннего раствора, т.е. их экзоцитоз происходит в условиях внутренней гипотонии. Указанный эффект весьма подробно изучен на примере клеток эндокринной и экзокринной секреции; однако есть основание предположить, что он окажется справедливым и для других секретирующих клеток, в том числе, для тромбоцитов. В частности, в работах А.Б. Самаль и соавт. было установлено, что при помещении

тромбоцитов человека в гипотоническую среду (0,06-0,1М NaCl) и в отсутствие внеклеточных ионов  $Ca^{2+}$  происходит увеличение светопропускания суспензии клеток, при этом клетки набухают и формируют псевдоподии [65, 260]. По мнению авторов, изменение морфологии тромбоцитов связано с перестройкой их цитоскелета в условиях гипотонии. По другим данным, активирующим действием на тромбоциты способны обладать гипертоничные растворы, поскольку в условиях гипертонии происходит активный выход из клеток высокорастворимых компонентов, к которым относятся все основные белки тромбоцитарных гранул [300]. В лабораторных условиях очень просто изменить тоничность среды с тромбоцитами, но при этом нужно учитывать, что такая среда будет нефизиологичной при инъекционном введении. Для изготовления биомедицинских изделий потребуется нормализация тоничности раствора с тромбоцитами, нанесение суспензий с измененной тоничностью на субстраты с дальнейшим их высушиванием, либо высушивание самой суспензии. В любом случае, необходимо будет исследовать характер биологической активности тромбоцитов в условиях измененной тоничности.

### ***Редокс-потенциал среды***

В литературе описаны примеры электрокоагуляции крови, при которой на поверхности анода с высоким положительным потенциалом происходит образование тромбофибриновых сгустков, причем их диаметр варьирует в зависимости от времени и силы тока [3]. По отношению к аноду исходные кровь или БотП выступают в качестве донора электронов, движение которых в сторону анода вызывает деполяризацию мембран тромбоцитов с их последующей активацией. В связи с этим возникает гипотеза о том, что образование тромбофибриновых сгустков можно получить путем повышения электрон-донорских свойств среды с тромбоцитами за счет изменения ее редокс-потенциала (РП). В биологии и медицине показатель редокс-потенциала (РП) используют в качестве интегральной характеристики окислительно-восстановительных процессов в биологических объектах. Определение РП позволяет оценить баланс про- и антиоксидантных систем биологических сред и

отдельных клеток, определить структурную целостность выделенных клеточных компартментов [111]. Для оценки РП чаще всего используют электрохимический метод, основанный на измерении разности потенциалов между инертным измерительным электродом, непосредственно контактирующим с биологической средой, и электродом сравнения при разомкнутой цепи [3, 17]. Известно, что интегриновые белки тромбоцитов (рецепторы к коллагену и фибрину) имеют в своем составе большое количество тиоловых (-S-S-) и дисульфидных (-SH) групп, баланс которых определяет функциональное состояние рецептора [213]. При адгезии или агрегации тромбоцитов возрастает активность дисульфидизомеразы, восстанавливающей -S-S- связи в составе интегриновых белков, что ведет к их перестройке, способствуя связыванию тромбоцитов с субстратом [140]. Похожий эффект можно также получить в условиях избытка -SH групп, в частности, с использованием антиоксиданта глутатиона [65,78]. Следовательно, создание нужного РП с помощью внешнего электромагнитного поля может позволить вызывать управляемую активацию тромбоцитов в отсутствие химических агентов. Электромагнитное воздействие на тромбоциты можно оказывать как контактными (путем погружения электрода в среду с тромбоцитами), так и бесконтактным способом, используя источники коротковолнового излучения. Необходимо определить физиологический диапазон РП, при котором тромбоциты будут сохранять свой морфофункциональный статус, а также диапазоны, при которых возможна агрегация или дегрануляция тромбоцитов

### ***Белки – неканонические кофакторы активации тромбоцитов***

Благодаря успехам биотехнологии и молекулярной инженерии сегодня есть возможность проведения экспериментальных работ с использованием большого числа специфических белков. Чаще всего используются белки, стимулирующие активацию клеток или их трансформацию. Среди этой группы большой интерес вызывают белки Wnt в связи с их про-онкогенными свойствами. Показано, что клетки меланомы, экспрессирующие на своей поверхности белки Wnt5a, являются высокоаффинными для тромбоцитов

человека, и при контакте с ними запускают характерную реакцию агрегации. Агрегация тромбоцитов облегчает инвазию опухолевых клеток внутрь сосудов, а также дополнительно стимулирует рост меланомы [244, 301]. В условиях *in vitro* белок Wnt5a в 2-3 раза усиливает интенсивность агрегации тромбоцитов БоТП под действием малых доз коллагена или тромбоксана. Wnt5a запускает передачу внутриклеточных сигналов по PI3K/Akt-пути, который в тромбоцитах стимулирует активацию циклооксигеназы и синтез тромбоксана A2 [185]. Все же, использование белков Wnt5 в области практических разработок заметно ограничено очень высокой стоимостью. Более доступными неканоническими ко-факторами активации представляются белки из семейства лектинов, в первую очередь – галектины, которые избирательно связываются с углеводами, обогащенными бета-галактозой. Установлено, что галектины-1 и -8 обладают способностью активировать тромбоцитарный рецептор GP Ib/IX/V (рецептор к фактору Виллебранда, vWF) и могут выступать в качестве аналога vWF. Это позволяет запустить агрегацию тромбоцитов даже в условиях полного отсутствия vWF [257]. Кроме того, галектины-1, -3 и -8 стимулируют активацию  $\alpha 2\beta 3$ -рецептора к фибриногену, экспрессию P-селектина, что приводит тромбоциты в состояние необратимой активации [265]. В норме галектины ассоциированы с волокнами межклеточного матрикса [66, 196], встречаются во многих соединительных тканях и, по всей видимости, участвуют в качестве «внешнего» активатора клеточного звена гемостаза – так у мышей с неработающим геном галектина-1 наблюдается удлинение времени кровотечения и снижение агрегационной активности [67]. С другой стороны, высокая способность галектинов к связыванию углеводных фрагментов может быть причиной развития различных воспалительных реакций за счет образования гетерогенных агрегатов из тромбоцитов и лейкоцитов, может стимулировать развитие тромботических и атеросклеротических осложнений [116]. В качестве факторов, снижающих избыточную активность галектинов, применяют блокаторы  $\alpha 2\beta 3$ - и АДФ-рецепторов, а также блокаторы циклооксигеназы [73, 265]. Тромбоцит-активирующими свойствами обладают и



растительные лектины, такие как фитогемагглютинин Р, лектин зародышей пшеницы (WGA), конканавалин А, лектин омелы белой [67]. Необходимо подчеркнуть, что в условиях высокого содержания лектинов усиливается взаимодействие не только между тромбоцитами, но и между другими циркулирующими клетками [196], поэтому использование лектинов для нормализации гемостаза в клинической практике должно сопровождаться подробным мониторингом. Наличие лектинов в составе тканевых трансплантатов может быть важным при производстве биологических конструкций, насыщенных тромбоцитами.

### *Активация тромбоцитов под действием наночастиц*

Дисперсные наноразмерные структуры (наночастицы) все чаще используют для работы с живыми системами в биологии, биоинженерии, медицине [189, 190, 253, 277]. Многие неорганические наночастицы обладают выраженным токсическим действием, но одновременно с этим ряд наночастиц обладает способностью к активации тромбоцитов без внесения стандартных индукторов. К ним относятся наночастицы золота размером до 20 нм, наночастицы на основе оксида кремния, кадмий-содержащие квантовые точки, углеродные нанотрубки, положительно заряженные поли-амид-аминовые дендримеры, липосомы [136, 217, 245, 262, 282, 310]. Очень часто активация тромбоцитов под действием наночастиц связана со спонтанной перестройкой мембранных  $\alpha_2\beta_3$ -рецепторов, которая характерна при воздействии активирующих доз АДФ. Кроме того, некоторые наночастицы увеличивают проницаемость тромбоцитарных мембран, что также может вызывать активацию тромбоцитов, в т.ч., в бесплазменной среде. Считается, что наличие на поверхности субстрата стабильного положительного электростатического заряда потенциально повышает его проагрегантные свойства по отношению к тромбоцитам [116, 253, 285]; вместе с тем, далеко не все тромбоцит-активирующие наночастицы имеют положительный заряд. Многие наночастицы обладают цитотоксическим действием и повреждают структурную целостность

тромбоцитов, как на фоне спонтанной активации, так и без активации [179, 183, 189, 206]. In vitro агрегация активированных наночастицами тромбоцитов снижается под действием апиразы (фермент, расщепляющий АДФ) или блокаторов металлопротеиназы 2, которая является кофактором  $\alpha_2\beta_3$ -рецепторов [125, 217, 310]. Весьма любопытно, что в зависимости от физических условий и характеристик наночастиц индуцированная ими активация тромбоцитов не всегда носит спонтанный и необратимый характер и может быть значительно пролонгирована [100, 190]. Некоторые из наночастиц активно используются в медицине при создании раневых и антибактерицидных покрытий, поэтому их комбинация с тромбоцитами может повысить реализацию их биологического потенциала.

### ***Перспективы использования неканонических путей активации тромбоцитов***

Все изложенные факты указывают на то, что тромбоцит представляет собой чрезвычайно чувствительную биологическую систему, активация которой может быть вызвана факторами, не связанными напрямую с гемостазом, адгезией и другими стандартными сигнальными путями. В результате, стоит по-новому оценить те случаи в научной и клинической практике, когда активация тромбоцитов считается спонтанной. Многие исследователи склонны связывать повышенную реактивность тромбоцитов с полиморфизмами белков-рецепторов активации, с другими генетическими аспектами [26, 88, 157]. Анализ мировой литературы показывает, что существует целый ряд факторов, которые вызывают спонтанную активацию тромбоцитов независимо от индивидуальных особенностей человека. Вместе с тем, неканонические пути активации тромбоцитов представляют большой интерес для научно-практических исследований, позволяют разрабатывать новые подходы к изучению тромбоцитов и их применению в области биологии, медицины и биоинженерии.

### 1.3. Способы стабилизации тромбоцитов на ранних этапах активации

Регуляция функциональной активности является неотъемлемой частью жизнедеятельности любых клеток, включая короткоживущие и высокоспециализированные клетки. Большую роль в регуляции играют ядерно-цитоплазматические взаимодействия, внешние сигналы, взаимодействия между цитоплазматическими структурами и компартментами. Тромбоциты человека не имеют ядерной ДНК, содержат очень малое число рибосом и матричных РНК, поэтому основными регуляторными путями являются элементы внутриклеточного сигналинга. В интактных тромбоцитах присутствуют системы, которые препятствуют спонтанной активации тромбоцитов. К ним относятся ферменты синтеза циклической АМФ, системы регуляции рН и редокс-потенциала цитоплазмы [107, 112, 209, 310]. Значительную роль в этом играют естественные антиоксиданты – глутатион и аскорбиновая кислота. Аскорбиновая кислота (АсК) широко используется в качестве антиоксиданта при неотложных состояниях, сопровождающихся системной воспалительной реакцией [59, 78, 293]. Инъекции АсК предотвращают закупорку капилляров путем ингибирования адгезии тромбоцитов на эндотелии, восстанавливают нормальный заряд мембран эндотелиальных клеток, нормализуют выработку оксида азота NO. Показано, что в норме тромбоцитарная АсК подавляет выработку в тромбоцитах эндогенной перекиси, снижает активность циклооксигеназы, в условиях оксидативного стресса АсК препятствует экспрессии на поверхности тромбоцитов провоспалительного лиганда CD40, вызывающего гиперактивацию лейкоцитов и образование лейкоцит-тромбоцитных агрегатов [275]. Установлено, что введение в кровь АсК снижает агрегационную активность тромбоцитов как *in vitro*, так и *in vivo* [143, 209]. С другой стороны, высокие концентрации АсК вызывают смещение редокс-потенциала среды в отрицательную область, при которой возможна спонтанная коагуляция [3]. До сих пор не проводилось подробного морфофункционального анализа тромбоцитов при воздействии разных концентраций АсК. Можно

предположить, что воздействие определенных концентраций АсК позволит заблокировать тромбоциты на ранних стадиях активации, в состоянии, когда тромбоциты уже адгезировали, но еще не выбросили гранулы. Такая стабилизация тромбоцитов и гранул в их составе имеет большое значение при создании биопрепаратов с цельными тромбоцитами, особенно при создании раневых покрытий. Для стабилизации необходимо заблокировать определенные пути внутриклеточного сигналинга, связанные, в первую очередь, с дегрануляцией тромбоцитов.

На сегодняшний день в клинической практике для лечения и профилактики тромботических осложнений используют препараты, которые избирательно блокируют определенные структуры, связанные с активацией тромбоцита (табл. 1). Это позволяет заметно снизить суммарную агрегационную активность тромбоцитарной популяции. В литературе можно встретить термин «антитромбоцитарные препараты» [32, 157], хотя корректнее называть их антиагрегантными. Накоплен огромный объем лабораторных данных о воздействии на тромбоциты препаратов-антиагрегантов *in vitro* и *in vivo* [8, 21, 215, 238, 281], но практически во всех исследованиях оценивается активность всего пула тромбоцитов, без учета их тонких морфофункциональных характеристик, в частности не оценивается способность тромбоцитов к адгезии.

Таблица 1 – Наиболее эффективные препараты-антиагреганты, принятые в клинической практике (Королева, Журавков, 2012 [32])

Блокаторы циклооксигеназы	Блокаторы фосфодиэстеразы	Блокаторы рецепторов к фибриногену	Блокаторы АДФ-рецепторов	
			«Непрямого» действия	«Прямого» действия
Ацетилсалициловая кислота	Дипиридамо́л	Тирофибан	Клопидогрель	Тикагрелор
		Абциксимаб	Прасугрель	Кангрелор
		Эптифибатид	Тиклопидин	

Наши предыдущие исследования показали, что под действием антиагрегантов клопидогреля и тикагрелора адгезивная активность тромбоцитов на стекле резко снижается вплоть до полного исчезновения при сохранении структурной целостности самих клеток [41]. Действие этих антиагрегантов основано на подавлении АДФ-зависимых рецепторов плазматической мембраны, что приводит к невозможности активации тромбоцита от внешних сигналов [11, 97]. При этом также отмечается способность тикагрелора к блокированию некоторых внутренних сигналов активации, которые в конечном итоге приводят к дегрануляции тромбоцитов [97]. Не исключено, что воздействие тикагрелора на уже адгезировавшие тромбоциты вызовет подавление дальнейших этапов адгезии тромбоцитов и их активации, т.е. позволит стабилизировать функционально пригодные тромбоциты на поверхности субстратов. Крайне любопытно, что перекись водорода в некоторых случаях тоже может выступать в качестве слабого антиагреганта. Есть данные, что низкие дозы  $H_2O_2$  (40-80 мкМ) способны снижать индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* [8, 9], что по всей видимости связано с воздействием перекиси водорода на редокс-системы тромбоцитов. Выявить стабилизацию тромбоцитов можно даже при их простом наблюдении в проходящем свете. В норме контакт тромбоцита с субстратом сопровождается ростом псевдоподий и ламеллоподий, которые затем сливаются в обширную ламеллу. Если в процессе адгезии тромбоцит испытывает действие стабилизирующего агента, формирование выростов цитоплазмы должно быть менее интенсивным. Этот эффект был показан при использовании наносеребра. Коллоидные наноструктурированные суспензии на основе серебра уже довольно долго используются во многих медико-биологических исследованиях. Широко описано бактерицидное действие покрытий с наносеребром [283], есть данные о том, что содержащие наносеребро трансплантаты обладают репаративным и регенеративным эффектами [100]. Вместе с тем, наночастицы серебра способны регулировать биологическую активность тромбоцитов. В работах индийских исследователей [103, 273, 274] весьма наглядно показано, что низкие концентрации наносеребра заметно

подавляют формирование тромбоцитами ламеллы и ламеллоподий, при этом структурная целостность тромбоцитов не нарушается, сохраняется целостность их мембран и цитоскелета. Следовательно, отсутствие роста ламеллы в данном случае вызвано именно стабилизацией тромбоцитов в интактном состоянии или на ранних стадиях активации, когда процесс активации еще не стал необратимым. Наночастицы серебра препятствуют полимеризации фибрина, уменьшают агрегацию тромбоцитов и общую активность гемостаза в целом [103, 274]. С другой стороны, в некоторых работах описаны случаи, когда наночастицы серебра не блокируют, а, напротив, стимулируют активность тромбоцитов [276]. Возникает противоречие в определении истинного эффекта наносеребра по отношению к тромбоцитам; не исключено, что здесь большую роль играет концентрация наночастиц в среде с тромбоцитами. Можно предположить, что разные дозы наносеребра оказывают принципиально разное действие на тромбоциты и их структуру. В связи с этим крайне важным представляется изучение морфофункционального статуса тромбоцитов под действием наночастиц серебра в разных концентрациях.

Физические факторы – давление, звук, свет, вибрация – часто вызывают повреждение тромбоцитов, что создает сложности при проведении определенных форм терапии [28, 59, 61]. С другой стороны, в ряде случаев физическое воздействие оказывает на клетки регуляторное воздействие. Так, низкоимпульсное лазерное излучение (НИЛИ) в видимой части спектра способно стимулировать многие процессы в клетках человека [27, 79]. Неоднократно показано, что облучение диплоидных клеток монохроматичным красным светом (630-638 нм) повышает их пролиферативную и миграционную активность [109, 198], запускает работу систем внутриклеточного сигналинга [13, 27, 199], в условиях *in vivo* стимулирует процессы ангиогенеза, способствует улучшению состояния пациентов при острых отравлениях, панкреатите, холецистите и других патологиях [28, 43, 47, 79]. Клинический эффект фотомодификации крови в значительной степени основан на увеличении

активности клеточных компонентов крови, в частности – тромбоцитов [27, 47]. Считается, что видимый свет в фиолетово-сине-зеленой области модулирует агрегационную активность тромбоцитов, а красный цвет – подавляет [43, 56, 311]; однако эти исследования проводились без подробного морфофункционального анализа клеток. Необходимо экспериментально исследовать тромбоциты после воздействия НИЛИ с разной длиной волны. Эффект фотоактивации тромбоцитов может быть очень удобен для неинвазивного выделения секретируемых тромбоцитами биологически активных веществ. Если окажется, что под действием НИЛИ можно стабилизировать тромбоциты, замедлять их дегрануляцию на фоне сохранения адгезивной активности, это будет крайне ценным для создания тромбоцитных биопрепаратов.

Необходимо учитывать, что морфофункциональный статус тромбоцитов, их цитокиновый состав и насыщенность гранулами характеризуют биологический потенциал тромбоцитов, но напрямую не отражают его эффективность при лечении тканевых дефектов. Для адекватной оценки биологического потенциала тромбоцитов и препаратов на их основе требуется проведение экспериментальных исследований.

#### **1.4 Исследование биологического потенциала тромбоцитов в эксперименте**

Для оценки эффективности тромбоцитных препаратов выбор адекватной модели имеет принципиальное значение. Такие процессы, как рост и дифференцировка клеток, их миграция, секреторная активность, могут быть подробно изучены *in vitro* с применением современных методик клеточной биологии. С другой стороны, в организме большинство клеток имеет иную, чем *in vitro*, топографию и межклеточную связь, *in vivo* клетки испытывают воздействие гораздо большего числа биологических, химических и физических

факторов. Поэтому любой препарат на основе тромбоцитов необходимо исследовать как *in vitro*, так *in vivo*.

#### **1.4.1 Исследования в культуре клеток**

Культуры диплоидных клеток являются очень удобной моделью для тестирования самых разных лекарственных препаратов. Работа с клеточной культурой позволяет в динамике оценивать морфофункциональные свойства клеток, определять токсичность и биосовместимость препарата, выявлять дозозависимые эффекты. К настоящему моменту получено большое количество данных по использованию компонентов БоТП в работе с клеточными линиями *in vitro*. Были исследованы самые разные формы препаратов: исходная неактивированная БоТП, активированная БоТП, содержащая лейкоциты БоТП, тромбоцитарный лизат, тромбоцитарный лизат после лиофилизации и регидратации, БоТП в составе биологических конструкций [38, 57, 72, 139, 142]. При этом оценку качества БоТП практически во всех случаях проводят путем количественного анализа содержащихся в ней ростовых и других факторов с применением метода иммуноферментного анализа, без предшествующего анализа качества самих тромбоцитов [87, 95]. Оценка биологической полноценности тромбоцитов чаще всего сводится лишь к определению общего числа клеток в исходной БоТП и почти никогда не включает анализ целостности их внутреннего состава и функциональной активности; в некоторых случаях исследования содержат данные по агрегометрии или тромбоэластографии исходных БоТП [157-160], что позволяет оценить общую функциональную активность клеточного компонента БоТП. Однако эти тесты не отражают состав популяции тромбоцитов, не позволяют определить соотношение биологически полноценных и неполноценных клеток, а также способность ими выполнять свои функции. В результате возникает определенная трудность с подбором адекватной дозы БоТП для разных типов культивируемых клеток. Широко распространено мнение, что независимо от типа препарата содержание клеток в исходной БоТП должно составлять не менее  $1000 \cdot 10^3/\text{мкл}$  (1 млн в мкл), в связи



с чем часто осуществляют концентрирование клеток в БоТП путем центрифугирования. Тестирование тромбоцитных препаратов чаще всего проводят на культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [16, 96, 118, 145, 172, 175, 249]. Неоднократно показано, что разные препараты на основе БоТП (неактивированная БоТП, активированная БоТП, лизат БоТП и др.) могут эффективно стимулировать пролиферацию ММСК, обладают синергетическим действием по отношению к факторам клеточной дифференцировки – например, комбинация инсулина с БоТП значительно увеличивает синтез липидов и ускоряет созревание адипоцитов (рис. 5). Считается, что БоТП не вызывает злокачественную трансформацию ММСК [132, 292, 309]; вместе с тем, влияние компонентов БоТП на ММСК часто носит дозозависимый характер (рис. 5,6) и избыточные концентрации БоТП вызывают угнетение роста клеток.

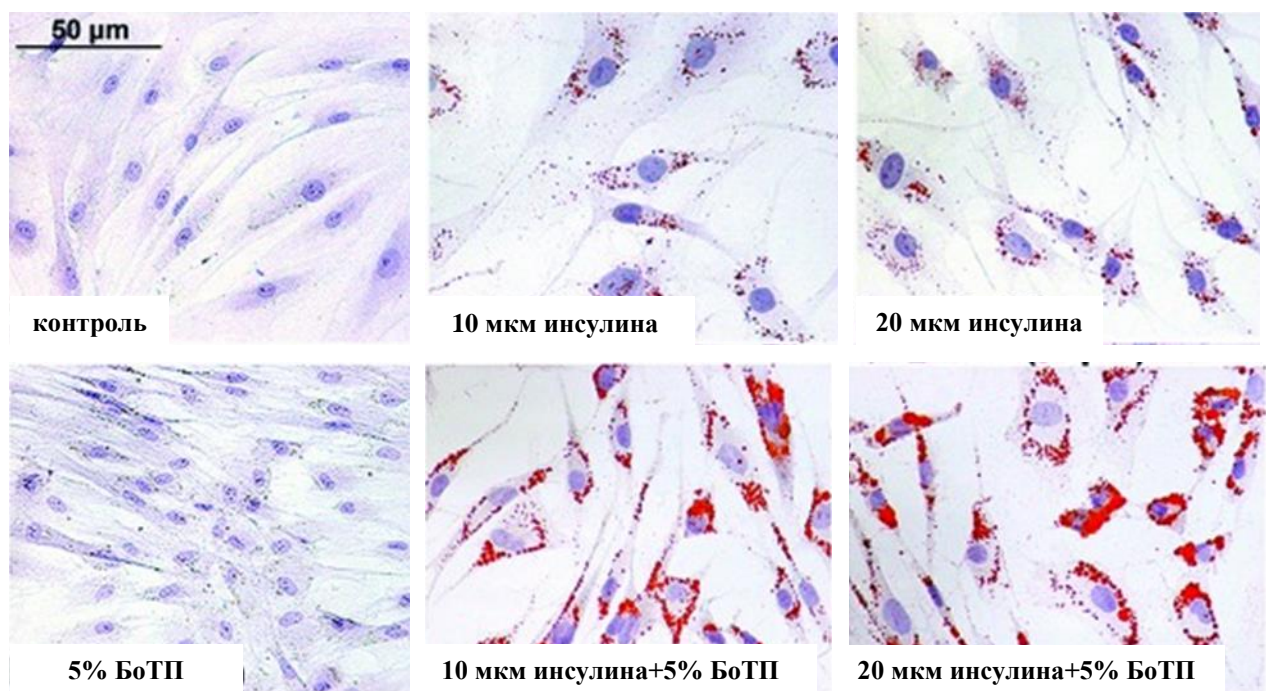


Рисунок 5 – Адипогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток под действием разных доз инсулина (верхний ряд) и инсулина в комбинации с БоТП (нижний ряд). Окраска маркером липидов Oil Red O и толуидиновым синим (из: Cervelli et al., 2012 [118]). Отчетливо видно, что присутствие БоТП в среде усиливает синтез липидов клетками.

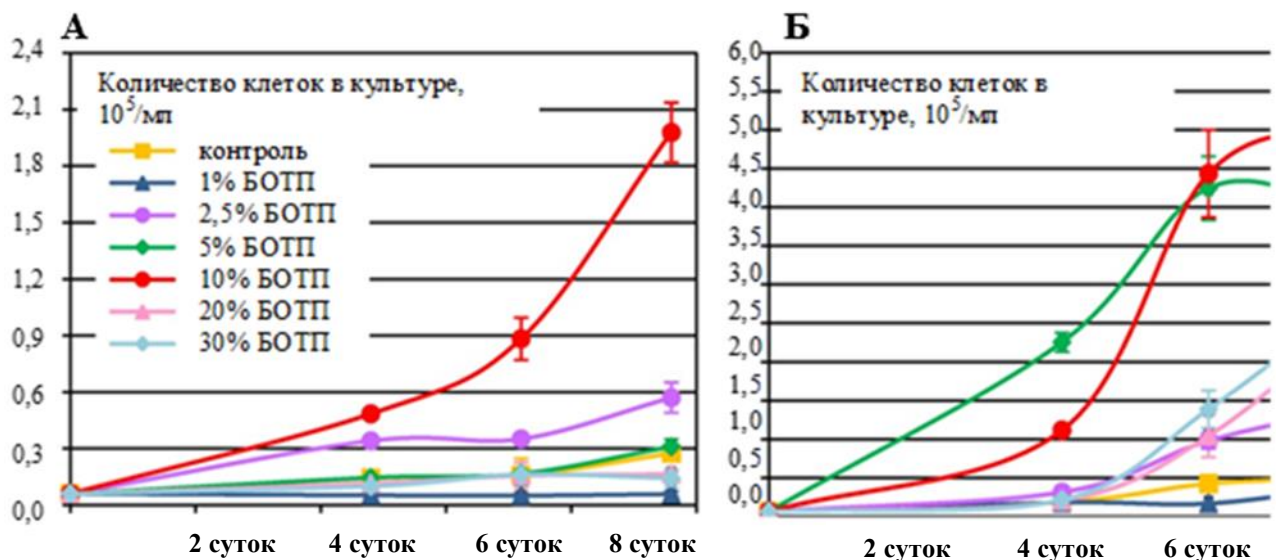


Рисунок 6 – Динамика роста мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из костного мозга (А) и жировой ткани (Б) в зависимости от концентрации БоТП в культуральной среде (из: Amable et al., 2014 [96]).

В работах Amable P.R. et al. (2014) показано, что пролиферативная активность ММСК, полученных из костного мозга и жировой ткани, может значительно меняться в зависимости от объема присутствующей в среде БоТП [96]. Примечательно, что наибольшая пролиферативная активность костномозговых и адипогенных ММСК наблюдалась при одной и той же концентрации БоТП, равной 10%, превышая контрольные значения в 7 и 10 раз соответственно (рис. 6); при более высокой концентрации БоТП в культуре с адипогенными ММСК интенсивность пролиферативной активности была ниже, чем при 10% БоТП, но вместе с тем достоверно выше чем в контроле, тогда как в культуре с ММСК из костного мозга наблюдалось угнетение роста клеток. Таким образом, в проведенном исследовании доза 10% БоТП была наиболее оптимальной для культур ММСК. Необходимо отметить, что в работах Amable et al. перед экспериментальным использованием БоТП подвергали дополнительному концентрированию в 10-15 раз путем седиментации клеток на центрифуге с последующим ресуспендированием в малом объеме бесклеточной плазмы [96]. Это могло приводить к разрушению ряда факторов или их

удалению вместе с плазмой. Тромбоциты человека являются клетками с очень высокой реактивностью, поэтому цитокиновый состав тромбоцитных препаратов может сильно зависеть от методики получения препарата, а также от качества тромбоцитов в исходной крови донора [28, 30, 69, 284]. В условиях избытка или нефизиологичного сочетания цитокинов препараты БоТП могут вызывать повреждение клеток. Ингибирующее действие БоТП неоднократно показано как на примере культур ММСК, так и на культурах остеобластов, хондробластов, астроцитов нейроглии [152, 176, 211, 223, 292]; во всех случаях в условиях чрезмерно высоких доз БоТП отмечается не только снижение пролиферативной активности, но и уровня секреции ими факторов, в норме направленных на стимуляцию процессов тканеобразования. Так, на культуре остеобластов показано, что 5 мкг/мл экзосом тромбоцитов в расчете на 200 тыс. клеток *in vitro* повышает активность синтеза клетками костного матрикса, а 50 мкг/мл – полностью подавляет синтез [295]. Ингибирующее действие больших доз БоТП часто объясняют наличием в них большого числа провоспалительных цитокинов. В частности, фактор некроза опухолей TNF- $\alpha$  в концентрации свыше 100 нг/мл вызывает массовый апоптоз клеток *in vitro* [176]. С другой стороны, TNF- $\alpha$  играет значительную роль в стимуляции ранних этапов репарации и в низких концентрациях усиливает действие ростовых факторов [49]. При использовании БоТП важную роль играет не только количество тромбоцитарных факторов, но и их соотношение. Известно, что белки семейства PDGF увеличивают пролиферативную активность как ММСК, так и дифференцированных клеток [94, 145, 180, 186], при этом комбинация PDGF-BB и b-FGF из тромбоцитных препаратов обладает гораздо большим рост-стимулирующим эффектом по сравнению с этими же факторами, полученными рекомбинантным путем, без использования тромбоцитов [142]. Соотношение ростовых факторов и про-воспалительных цитокинов и других факторов заметно варьирует в разных работах, что в конечном итоге может заметно влиять на эффекты БоТП *in vitro*. В условиях культуры клетки находятся в замкнутом объеме, тесно контактируют друг с другом, при этом их миграционная

способность ограничена площадью культурального флакона. Многие биологические процессы, например, ангиогенез, требуют взаимного участия разных типов клеток, что в условиях монокультуры является недостижимым. Показано, что под действием тромбоцитных препаратов клетки эпителиального происхождения могут создавать трубчатые, сосудоподобные структуры *in vitro* [202, 269], однако при работе с экспериментальными животными такие структуры совершенно не выявляются. Тромбоциты стимулируют рост многих эпителиальных клеток, включая эндотелиоциты. В некоторых работах для оценки ангиогенеза используют живые экспланты хориона и аллантаоиса [141, 229]. Под действием оптимальной дозы лизата БоТП в хорионе и аллантаоисе увеличивается сеть мелких сосудов. Стимуляция ангиогенеза происходит при синергетическом действии целого ряда факторов, при этом по мере роста сосуда соотношение факторов меняется [203]. Значительная часть этих веществ присутствует в тромбоцитарных гранулах. Вместе с тем, тромбоциты также содержат анти-ангиогенные факторы [154], которые обычно не оцениваются иммуноферментным анализом, в результате чего прогнозирование эффекта также может быть затруднено. Таким образом, несмотря на огромный фактический материал, исследование тромбоцитных препаратов *in vitro* требует дальнейшего активного продолжения.

#### **1.4.2 Исследования *in vivo* в эксперименте и в клинической практике**

Тромбоцитные препараты могут иметь самую разную композицию – от простой суспензии тромбоцитов или их компонентов в плазме до сложных тканеподобных конструкций. Для клинического применения очень удобными являются инъекционные формы препаратов, поскольку они достаточно просты в изготовлении и применении. Установлено, что инъекции БоТП оказывают положительное действие при лечении различных патологий соединительной ткани [54, 64, 135, 258]. Инъекционное введение аутологичной и аллогенной БоТП стимулирует пролиферацию клеток, а также синтез гликозаминогликанов

и протеогликанов в хрящевой ткани (рис. 7), межпозвоночных дисках, связках, способствует снижению отека и восстановлению исходной архитектоники коллагеновых волокон [148, 203, 218, 246]. В опытах по искусственному моделированию хронической ишемии у крыс [74] показано, что после двукратной инъекции БоТП интенсивность микроциркуляции в зоне ишемии на 10-28 сутки увеличивается в 1,9-2,3 раза по сравнению с контрольной группой (без лечения) и в 1,5-2,1 раз по сравнению с группой лечения пентоксифиллином, что говорит о стимуляции неоангиогенеза. Внутрисуставное введение неактивированной БоТП при остеоартрите останавливает дальнейшее развитие патологии, снижает болевой порог и стимулирует хондрогенез [148, 150, 169, 236]. Однако эффективность такого лечения сильно варьирует у разных пациентов – в частности, у лиц старше 60 лет регенерация суставного хряща под действием интактной БоТП идет гораздо медленнее, чем у лиц более молодого возраста, или вообще не идет [223, 235, 258]. При введении неактивированной БоТП в зоны повреждения кости (кортикальной или губчатой) стимуляция репарации кости полностью отсутствует [155].

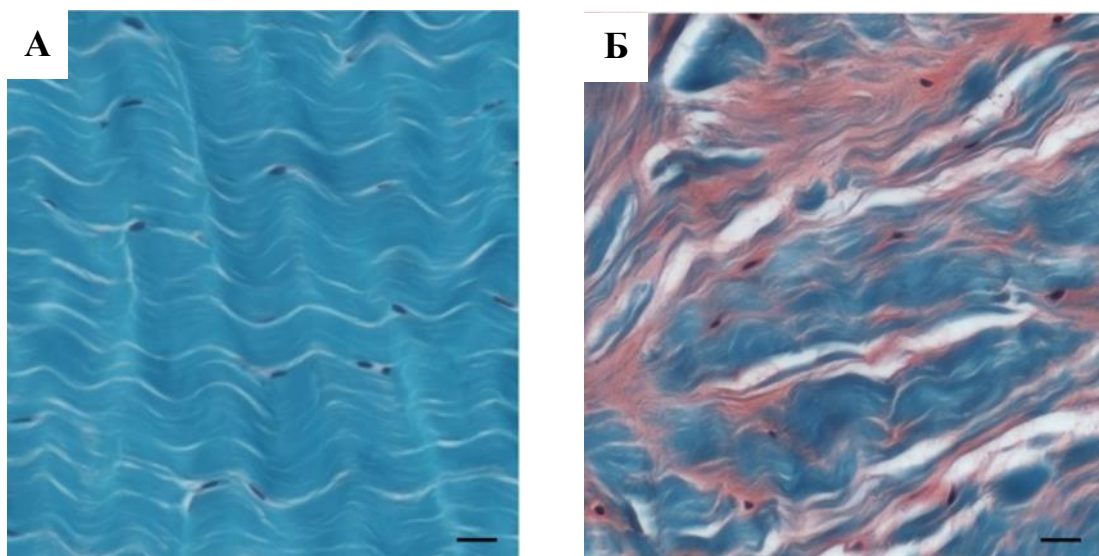


Рисунок 7 – Выявление гликозаминогликанов в фиброзном кольце межпозвоночного диска до (А) и после (Б) инъекции БоТП в эксперименте (из: Pirvu et al., 2014 [247]). Окраска сафранином-О и толуидиновым синим. Масштабная линия 50 мкм. Сафранин-О окрашивает новосинтезированные гликозаминогликаны в красно-розовый цвет. Инъекция БоТП стимулирует интенсивный синтез гликозаминогликанов клетками фиброзного кольца.

Репаративный эффект неактивированной БоТП связывают с двумя процессами: дегрануляция биологически полноценных тромбоцитов при контакте с тканями и разрушение тромбоцитов *in vivo*, приводящее к массовому пассивному выходу содержимого гранул за пределы клеток [98, 154, 204]. Первая причина представляется более вероятной, поскольку соединительные ткани содержат большое количество компонентов внеклеточного матрикса, адгезивно-привлекательных для тромбоцитов – помимо коллагена, в их число входит фибронектин, витронектин, ламинин, гиалуроновая кислота [128, 271] (в случае кости доступ к ним резко ограничен вследствие минерализации костной ткани). Напротив, разрушение клеток всегда сопровождается резкой дезорганизацией всех клеточных компартментов, в т.ч. на молекулярном уровне [89-92], лизисом мембран и белковых комплексов. При ряде патологий разрушение тромбоцитов идет параллельно с их спонтанной активацией, в результате чего уровень тромбоцитарных компонентов и ТМч в циркулирующей крови может увеличиваться на фоне очень низкого качества самих тромбоцитов [5, 194, 213, 245]. В таких случаях определенным репаративным потенциалом может обладать бесклеточная плазма или сыворотка, но не сами тромбоциты. Поэтому использование интактной БоТП в клинической практике должно подразумевать возможность проявления тромбоцитами их биологической активности.

Одним из недостатков неактивированной БоТП является короткий срок ее хранения. В отличие от интактной БоТП, тромбоцитарный лизат можно хранить в стерильных условиях в течение длительного времени, что является очень удобным в научной и клинической практике. В процессе приготовления лизата тромбоциты подвергают криодеструкции, благодаря чему компоненты тромбоцитарных гранул выходят в раствор без активации тромбоцитов. Как правило, тромбоцитарный лизат представляет собой плазму, из которой фрагменты разрушенных тромбоцитов удалены путем центрифугирования [24,72]. Неоднократно показано, что инъекции тромбоцитарных лизатов ускоряют миграцию клеток в область раны, стимулируют неоангиогенез, даже в

случае использования ксеногенных КТ [141, 203, 222]. При этом биологическим эффектом обладают не только стандартные лизаты, но также лизаты, подвергшиеся лиофильному высушиванию и хранению при низкотемпературных температурах (рис. 8). Необходимо учитывать, что инъекционное введение препаратов на основе БоТП сопряжено с риском потери или вымывания значительной части биологически активных компонентов, выделяемых тромбоцитами. В связи с этим возникает необходимость закрепления тромбоцитов и их содержимого внутри стабильных матриц.

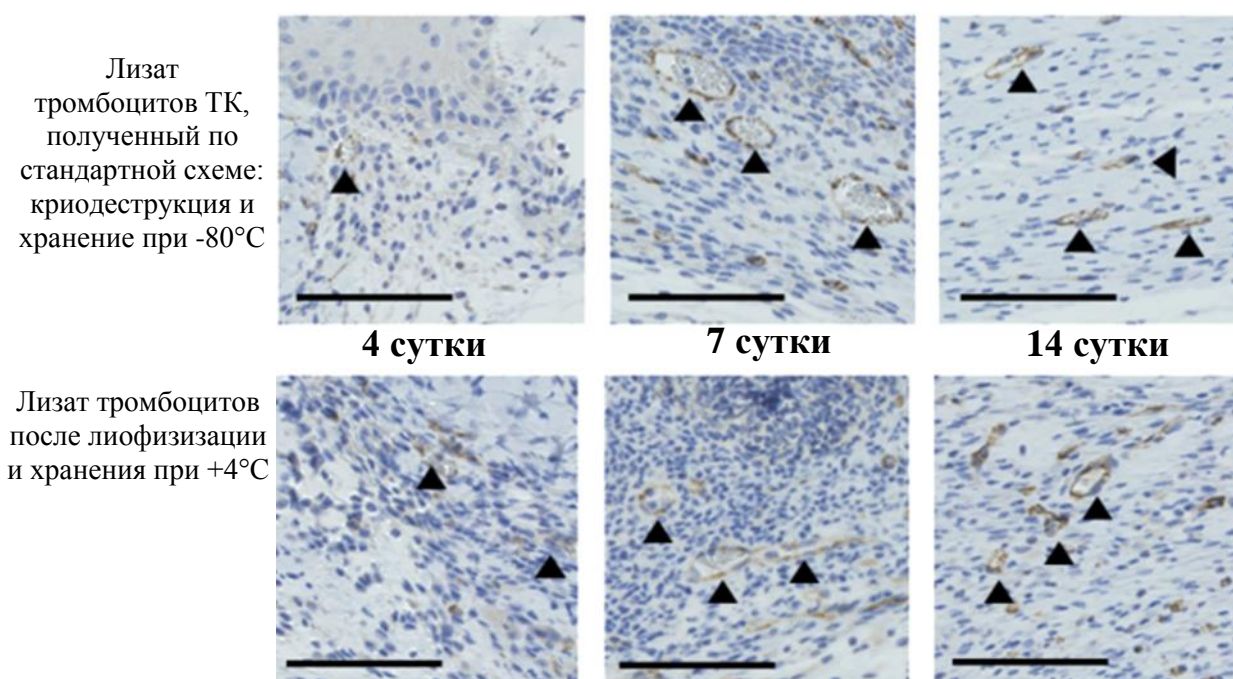


Рисунок 8 – Стимуляция ангиогенеза в экспериментальной ране под действием ксеногенных тромбоцитарных лизатов (из: Notodihardjo et al., 2018 [223]). Масштабная линия 1 мм. Стрелками показаны новообразованные сосуды, окрашенные методом иммуноцитохимии.

Простейшим способом получения тромбоцит-содержащей матрицы является стимуляция БоТП индуктором коагуляции. Чаще всего для этой цели используют тромбин или хлорид кальция, при этом считается, что активация кальцием в большей степени способствует сохранению ростовых факторов в составе образующегося тромбофибринового сгустка, нежели активация

тромбином [158, 270, 278]. Полученный в результате активации БоТП сгусток имеет гелеобразную консистенцию, поэтому в литературе такой препарат часто называют «тромбоцитарный гель» [51, 192, 279]. Показано, что БоТП в виде геля эффективно стимулирует остеогенез в зубных альвеолах после экстракции зуба [119, 261] и при переломах костей челюсти [93, 108], ускоряет рост кости при диабетических переломах [279], может быть использован при диабетической остеоартропатии и других дефектах губчатой кости [108, 263, 265]. Показана высокая эффективность аппликаций тромбоцитарного геля из аутологичной БоТП при лечении длительно незаживающих трофических ран [50]. При этом считается, что тромбоцитарный гель сохраняет свой регенераторный потенциал не более 7 суток, по истечению которого ростовые и другие факторы тромбоцитов полностью элиминируются [203]. В связи с этим ряд исследователей предлагает наполнять тромбоцитарный гель микрофрагментами аутологичной или ксеногенной кости, а также изделиями на основе фосфата кальция для повышения адсорбции факторов, выделенных тромбоцитами [149, 300, 312]. В литературе нет достоверных данных о положительном влиянии указанных компонентов на сохранность ростовых факторов; вместе с тем, наполнение тромбоцитарного геля структурами, имитирующими кость, а также стромальными клетками костного мозга повышает скорость регенерации кости при остеонекрозе челюсти и суставов, при переломах берцовых костей [128, 263]. Показано, что подложка на основе БоТП и 3-кальций фосфата является адгезивно привлекательно для мезенхимальных стволовых клеток, стимулирует их миграцию и остеобластную дифференцировку как *in vitro*, так и *in vivo* [228-230]. Идея насыщения тромбоцитарного геля цитокинами и факторами дифференцировки кости (BMP-2, BMP-7, TGF- $\beta$ 1 и др.) часто обсуждается [108, 236, 240, 307], однако у исследователей нет единого мнения об адекватном количестве этих факторов, необходимом для введения в БоТП. Установлено, что избыток TGF- $\beta$ 1 может привести к обширным воспалительным реакциям, резко подавляет активность остеокальцина (фактор связывания кальция) [169, 1786 212], т.е. действие TGF- $\beta$ 1 в данном случае сходно с



действием TNF- $\alpha$ , хотя в норме эти факторы являются антагонистами. В присутствии TNF- $\alpha$  резко усиливается активность лейкоцитов, что может в значительной степени нивелировать репаративный потенциал тромбоцитарного геля или инъекционных форм БоТП. Данные о биологическом эффекте БоТП с лейкоцитами весьма противоречивы. Есть мнение, что наличие лейкоцитов в составе тромбоцитарного геля усиливает его антибактериальное действие [33, 137, 212]. С другой стороны, в разных источниках отмечается подавление репаративных процессов, в частности угнетение роста кости в присутствии геля из БоТП, насыщенного лейкоцитами [132, 243, 254]. Поэтому большинство исследователей рекомендует использовать БоТП без лейкоцитов [87, 95, 206].

На сегодняшний день многие остеопластические и остеоиндуктивные конструкции применяются в комбинации с БоТП или факторами, выделенными из тромбоцитов, но во всех случаях авторы отмечают проблему быстрого разрушения тромбоцитарных факторов. Поэтому предлагается заключать неактивированную БоТП внутрь гелеобразных матриц, которые после затвердевания оказываются насыщенными биологически активными веществами тромбоцитов. В качестве исходного материала геля могут быть использованные соединения альгината или желатина. Показано, что альгинатные и желатиновые гидрогели являются эффективными переносчиками тромбоцитарных компонентов, стимулируют размножение ММСК, фибробластов и остеобластов *in vitro* и *in vivo* [166, 212]. Высвобождение ростовых и других факторов происходит по мере постепенного разрушения гидрогеля, что значительно продлевает срок их сохранности. С другой стороны, процесс врастания сосудов и костных балок собственно в область гидрогеля с дальнейшим его замещением полноценной костью может быть весьма растянут [128, 279]. Естественно предположить, что формирование костной ткани пойдет быстрее, если трансплантат изначально будет иметь внутреннюю архитектуру, топологически близкую матриксу нормальной кости. Поэтому аутологичная кость считается «золотым стандартом» костного трансплантата благодаря минимальной

вероятности иммунного ответа и сохранности исходной трехмерной архитектуры костной ткани [82]. Однако во многих случаях использование фрагментов кости человека в комбинации с БоТП не приносило желаемого эффекта, независимо от размера дефекта [114-117, 128]. Нужно сказать, что в этих работах чаще всего использовали неактивированную БоТП, которая, как уже говорилось, крайне плохо активируется при контакте с костью и не высвобождает тромбоцитарных компонентов при таком подходе. Гораздо эффективнее действует тромбоцитарный гель в комбинации с костным деминерализованным матриксом [158, 202]; считается, что материал губчатой деминерализованной кости осуществляет синергетический эффект совместно с факторами роста, выделенных из тромбоцитов [203]; тем не менее, скорость заживления и остеогенеза при одних и тех же костных патологиях сильно варьирует у разных пациентов [115, 116]. К причинам, ингибирующим остеогенез, здесь относят низкое содержание ростовых факторов в тромбоцитах исходной БоТП; низкий уровень приживления трансплантата; развитие воспалительной реакции под действием провоспалительных цитокинов, выделенных тромбоцитами; трудность выбора эффективной дозы тромбоцитного препарата [224]. Тромбоцитарный гель также используется в трансплантатах, изготовленных на основе композитных материалов, имитирующих трехмерную кость: 3-кальций фосфат [300, 312], гидроксиапатит [117, 297], матриксы из полимерных нанофибрилл, полученные путем электрического прядения [105, 108, 241, 267]. Из этих материалов изготавливают пенообразные, пористые структуры, иногда ассоциированные с ростовыми и другими факторами; пористость матриксов облегчает проникание в них тромбоцитарного геля после активации БоТП (рис. 9).

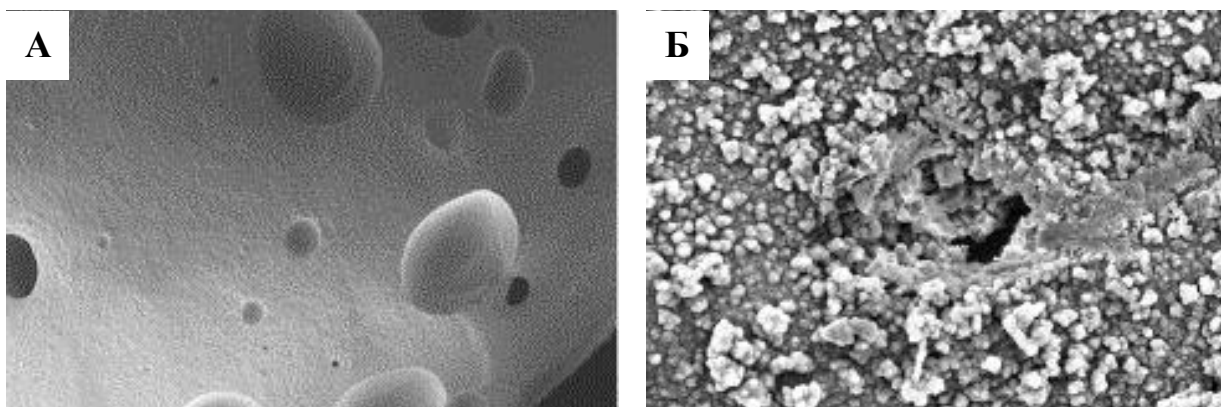


Рисунок 9 – Биотрансплант на основе 3-кальций фосфата, совмещенный с БоТП.

Из: Wang et al., 2014 [300]. Сканирующая микроскопия. Увеличение x500.

А – поверхность исходного трансплантата; Б – трансплантат, насыщенный тромбоцитарным гелем из БоТП.

На сегодняшний день эффективность таких трансплантатов показана, главным образом, на экспериментальных моделях [241], хотя есть сведения и об их использовании в клинической практике – например, при лечении периодонтита [296, 304]. При этом сами авторы признают, что нередко костные трансплантаты, содержащие большое количество факторов БоТП, имеют такой же биологический и клинический эффект, что и аналогичные трансплантаты без БоТП, т.е. присутствие БоТП не давало дополнительного вклада в репарацию костных дефектов. Это может быть связано с потерей факторов тромбоцитов в процессе растворения или высыхания тромбоцитарного геля. Решение этой проблемы можно достичь путем закрепления факторов тромбоцитов или самих тромбоцитов на твердом субстрате еще на стадии производства трансплантата или благодаря реализации адгезивной активности тромбоцитов на трансплантате с их дальнейшей стабилизацией до начала дегрануляции.

### **1.5 Получение инъекционных тромбоцитных препаратов**

Тромбоцитные препараты в виде раствора или суспензии удобны тем, что для их введения применяются малоинвазивные методики, при этом для получения таких препаратов, как правило, используется простой инструментарий, широко доступных клиницистам. В клинической практике для

инъекционного введения чаще всего используют богатую тромбоцитами плазму (БоТП) или лизат, полученного путем криодеструкции тромбоцитов (тромбоцитарный лизат) [25, 70]. Процедура заготовки БоТП до сих пор не является стандартизированной. Центрифугирование применяется практически во всех методах выделения тромбоцитов. Для отделения фракции тромбоцитов от эритроцитов и лейкоцитов цельной крови обычно используют «мягкое» ускорение от 150 до 500 g, после чего тромбоциты осаждают при 700-3000 g с целью концентрирования [30, 51, 57, 141]. Широко распространено мнение, что для осуществления высокого биологического эффекта БоТП должна содержать не менее 1 млн тромбоцитов в 1 мкл, поэтому выделенную из крови первичную плазму чаще всего подвергают дополнительному центрифугированию с большим ускорением. В ряде работ концентрированную БоТП выделяют путем однократного центрифугирования крови при 600-800 g [50, 87, 124, 221]. При таком подходе внутри одного флакона вся плазма разделяется на несколько фракций. Собственно БоТП представляет та из них, которая после центрифугирования расположена ближе всего к слою лейкоцитов. Над этой фракцией находятся фракции с меньшим содержанием тромбоцитов, их использовать не рекомендуют [51]; отбор БоТП осуществляют путем предварительного удаления всех верхних фракций плазмы или путем аккуратного аспирирования нижней фракции, что в обоих случаях создает риск спонтанного перемешивания плазмы. Если при отборе насыщенной тромбоцитами фракции происходит захват подлежащего слоя лейкоцитов, получают препарат БоТП с лейкоцитами (лейкБоТП). В зависимости от типа центрифуги время и скорость центрифугирования могут значительно варьировать. Обычно центрифугирование цельной крови проводят в стандартных пробирках с консервантами (цитрат, гепарин, ЭДТА). Для отбора фракции тромбоцитов требуется разгерметизация пробирок, что, соответственно, создает риск нарушения стерильности биоматериала. Для забора БоТП без разгерметизации существует специализированная система Arthrex, состоящая из двух совмещенных шприцов. Через первый шприц набирается кровь и

смешивается с антикоагулянтом, проводится центрифугирование в центрифуге системы Rotofix, после чего во втором шприце оказывается плазма с тромбоцитами. Шприц герметично отделяется от системы и позволяет инъекционно вводить стерильный материал [133]. Суспензия тромбоцитов может быть также получена в бесплазменной среде, путем осаждения тромбоцитов в процессе центрифугирования. Замена плазмы на бесплазменную среду оправдана в тех случаях, когда необходимо избежать агрегации тромбоцитов и полимеризации фибрина. В бесплазменной среде тромбоциты не способны агрегировать, при этом в условиях нормальной тоничности и pH морфофункциональный статус тромбоцитов сохраняется, в частности сохраняется их способность к адгезии и активации в целом. При получении препаратов на основе БоТП стандартные индукторы активации тромбоцитов (АДФ, адреналин и др.) обычно не используют, однако известен метод по фотоактивации БоТП [150, 235]. Тромбоциты в составе БоТП облучают длинноволновым УФ-светом, в результате чего происходит активация и перестройка тромбоцитов, высвобождение секретируемых ими факторов без внесения дополнительных веществ. Использование низкоимпульсного лазерного излучения создает возможность неинвазивной активации тромбоцитов, что может быть очень востребованным в ряде случаев. Однако на настоящий момент влияние фотоактивации на морфофункциональный статус тромбоцитов не изучено.

Вопрос использования аллогенной БоТП до сих пор является дискуссионным. Есть отдельные работы, где при лечении пациентов использовались биопрепараты на основе аллогенной БоТП, при этом не возникало иммунологических или клинических осложнений [173, 279]. Аллогенная БоТП широко используется в экспериментальных работах на животных *in vivo*, некоторые типы биопрепаратов, например, пулированный лизат БоТП, может быть получен только из аллогенного материала [305-308]. Вместе с тем у клиницистов остается высокая настороженность к использованию

материала аллогенных тромбоцитов в клинической практике. Потенциально, источником аллогенного тромбоцитного биоматериала могут выступать аферезные тромбоконцентраты, содержащие 200-300 млрд тромбоцитов в дозе, с очень большим пулом репаративных факторов [142, 223]. Использование аллогенных тромбоцитов остро ставит проблему карантинизации и исключения риска передачи гемотрансмиссивных инфекций [59, 252]. При работе с КТ короткого хранения единственным способом устранения риска инфицирования патогенами является их направленная инактивация. К настоящему моменту наиболее распространены фотодинамические методы патоген-инактивации с использованием ДНК- и РНК- интеркаляторов, в первую очередь, амтосалена. Считается, что использование патоген-инактивированных КТ не оказывает значительного отрицательного влияния на клиническую эффективность трансфузий, хотя при этом скорректированное число прироста тромбоцитов и их выживаемость в крови достоверно ниже, чем при использовании обычных КТ [252]. Поэтому применение аллогенных КТ как источника факторов репарации и регенерации все еще не рассматривается. С другой стороны, широко описаны препараты на основе лиофилизированных компонентов тромбоцитов. В одних случаях исходную БоТП подвергают криодеструкции и лиофилизируют тромбоцитарный лизат [69, 70, 220, 284], в других сразу лиофилизируют тромбоциты БоТП без предварительных обработок [177, 222]. Полученную фракцию подвергают стерилизации с помощью жесткого излучения. Такой препарат можно хранить при слабоотрицательных или даже при комнатных температурах. По данным разных авторов, после регидратации тромбоцитарный лизат сохраняет более 50% от всего объема ростовых факторов и является эффективным при лечении экспериментальных ран [57, 69, 223]. Однако в широкой клинической практике использование аллогенного материала лиофилизированных тромбоцитов до сих пор не представлено. К настоящему моменту в клинической практике апробированы лизаты на основе аутологичной БоТП [86, 186, 243]. Тромбоцитарный лизат представляет собой биопрепарат, полученный путем разрушения аутологичных тромбоцитов БоТП при низких

или ультранизких температурах. Тромбоцитарные лизаты могут быть приготовлены из БоТП с очень высоким содержанием тромбоцитов, что позволяет получать препараты, насыщенные ростовыми факторами. Процедура изготовления тромбоцитарного лизата позволяет одновременно выделять из клеток все ростовые факторы. Однако одновременно с этим тромбоциты выбрасывают провоспалительные факторы, обладающие явным патогенетическим действием. Кроме того, гранулы тромбоцитов содержат большое количество веществ, обладающих протеолитической активностью (кислые фосфатазы, металлопротеазы, гликозидазы), которые в условиях плазмы крови могут вызывать быстрое расщепление ростовых факторов, значительная часть тромбоцитарных факторов и других может быть сорбирована молекулами альбумина [99, 208, 299]. В результате данные о содержании основных ростовых факторов в тромбоцитарных лизатах сильно варьируют у разных авторов: так, концентрации PDGF и EGF в лизатах, полученных разными исследователями, могут отличаться более чем в 10 раз на фоне одинаковой общей концентрации тромбоцитов в исходных БоТП [38, 72, 85]. По всей видимости, этот эффект вызван недостаточной стабильностью ростовых факторов в составе плазмы. Методики выделения тромбоцитарного лизата также заметно варьируют в плане выбора режимов заморозки и дефростирования.

### **1.6 Получение аппликативных тромбоцитных препаратов**

Очень часто в регенеративной медицине требуется закрыть или заполнить определенную зону тканевого дефекта, иногда весьма обширную [19, 73, 225]. В этих случаях применение инъекционных препаратов представляется недостаточным. Разработка репаративных биоконструкций и биотрансплантатов ведется с конца XX-го века; к настоящему времени известно большое число подходов к использованию тромбоцитов или их компонентов в составе таких изделий. Показано, что инкорпорирование факторов роста и дифференцировки внутри композитных структур, органических и неорганических матриц, значительно увеличивает срок их сохранности и, соответственно, удлиняет

репаративный эффект [7, 287, 302, 312]. Биотрансплантаты, насыщенные факторами роста и дифференцировки, считаются очень перспективными для лечения дефектов костной ткани, для производства таких биотрансплантатов активно используют методы 3-D печати [300, 312, 314]. Несмотря на обнадеживающие результаты экспериментов, эти технологии апробированы преимущественно на лабораторных животных и требуют оптимизации. Кроме того, инкорпорирование подразумевает использование биологического потенциала тромбоцитарных компонентов, но не самих тромбоцитов. Тромбоциты обладают рядом специфических функций, связанных с привлечением клеток в зону тканевого дефекта, усиление межклеточных взаимодействий, формирование субстрата для клеток [36, 92, 195, 213]. Для этих процессов необходимо непосредственное присутствие тромбоцитов, как клеточных структур. Значительным ограничением здесь является очень короткий срок жизни тромбоцита после активации и выброса гранул. Поэтому тромбоцит-насыщенные биотрансплантаты оправдано использовать в тех случаях, когда есть возможность регулярной смены трансплантата. Это возможно при лечении обширных ран кожи, трофических язв, ожогов, а также при ряде патологий костной ткани. Для лечения таких дефектов могут быть применимы различные аппликативные препараты на основе тромбоцитов.

В настоящее время широко описано использование тромбоцитарного геля. Тромбоцитарный гель представляет собой биопрепарат, который образуется из богатой тромбоцитами плазмы в результате активации плазменного звена гемостаза и тромбоцитов *in vitro*. В литературе можно также встретить термины «platelet-rich fibrin, PRF» (богатый тромбоцитами фибрин), L-PRF (PRF, полученный из БотП с лейкоцитами) [137, 151]. Тромбоцитарный гель является удобным для использования биологического потенциала тромбоцитов в травматологии, хирургии, при производстве комбинированных биотрансплантатов и биоконструкций. Тромбоцитарный гель легко распадается на две фракции: сыворотку и тромбофибриновый сгусток (ТФ), который также



имеет гелевую нерастворимую консистенцию. В условиях ЛПУ получение ТФ может осуществлено разными способами. Наиболее простым является центрифугирование неконсервированной крови пациента при 100-500 г. В результате весь объем крови принимает форму геля, при этом его верхняя часть не содержит эритроцитов и после удаления жидкой фракции представляет собой чистый ТФ [261]. Выделение ТФ из неконсервированной крови не требует введения никаких дополнительных активаторов и является широкодоступным. Установлена высокая эффективность таких препаратов при лечении дефектов костной ткани челюстного аппарата [261, 263]. С другой стороны, такой подход требует немедленного использования ТФ, не позволяет оценить качество тромбоцитов в его составе, а также затрудняет подбор адекватной дозы препарата. Поэтому при получении ТФ чаще всего используют БоТП, выделенную из консервированной крови [52, 80, 150,158]. Образцы исходной крови центрифугируют для получения БоТП, затем активируют фибринообразование *in vitro*. При этом активация БоТП ионами кальция является более эффективной по сравнению с тромбином или его аналогами. Для стимуляции фибринообразования в БоТП чаще всего используют раствор 10%-ного раствора хлорида кальция, из расчета 50-70 мкл раствора на 1 мл исходной БоТП [51]. Концентрация ионов кальция в конечной смеси составляет 30-40 мМ. В присутствии 30-40 мМ хлорида кальция образование ТФ происходит в течение 10-30 мин при 37°C. Полученный ТФ имеет высокую эффективность при лечении хронических трофических ран, при диабетических переломах, при диабетической остеоартропатии и других дефектах губчатой кости. Вместе с тем, в составе таких сгустков происходит быстрая потеря ростовых факторов и других цитокинов, секретируемых тромбоцитами. Поэтому предлагается заключать неактивированную БоТП внутрь гелеобразных матриц, которые после затвердевания оказываются насыщенными биологически активными веществами тромбоцитов. В качестве исходного материала геля могут быть использованные соединения альгината или желатина. Показано, что альгинатные и желатиновые гидрогели являются эффективными переносчиками факторов

тромбоцитов, стимулируют размножение остеобластов в культуре *in vitro* и *in vivo* [166]. Высвобождение факторов тромбоцитов происходит по мере постепенного разрушения гидрогеля, что значительно продлевает срок их сохранности. Тромбоциты можно наносить в составе неактивированной БоТП на многие адгезивные субстраты: коллаген, хитозан, гиалуроновую кислоту и др. [92, 255]. Примечательно, что адгезивно привлекательные для тромбоцитов вещества в значительном количестве присутствуют в составе тканевых трансплантатов, в первую очередь, бесклеточного дермального матрикса [85]. Таким образом, некоторые из тканевых трансплантатов можно использовать в качестве матриксов при создании тромбоцитных биопрепаратов. На сегодняшний день широко описан репаративный эффект повязок на основе коллагена человека I типа. Коллагеновые повязки широко используются в качестве раневых покрытий в комбустиологии, обладают высокими абсорбционными свойствами, являются пластичными [19, 58, 278]. Коллаген в составе таких повязок имеет низкую степень конденсации и поэтому является адгезивно привлекательным для многих клеток. Удивительно, но практически нигде не предлагается создавать раневые покрытия путем совмещения коллагеновых матриц и тромбоцитов. Описаны примеры насыщения тромбоцитами БоТП деминерализированной губчатой кости [201, 227, 234]; в качестве раневых покрытий с высокими абсорбционными свойствами предлагается использовать различные органические полимеры (полилактиды, альгинаты, наноструктурированная целлюлоза) [122, 211, 270]. Такие покрытия обладают способностью удерживать большое количество растворимых соединений, поэтому их можно насыщать биологически активными веществами, включая факторы роста и дифференцировки в составе тромбоцитарных лизатов. Насыщение раневых покрытий цельными тромбоцитами описано только в редких работах по исследованию экспериментальных животных и до настоящего времени не рассматривалось в клинической практике как перспективное направление. Вместе с тем, аппликативные биотрансплантаты с тромбоцитами могут иметь заметное преимущество благодаря синергетическому действию

тромбоцитов и их компонентов. Быстрая дегрануляция тромбоцитов на коллагеновых субстратах может частично нивелироваться адгезией ТМч на коллагене. Как показано, ТМч содержат те же рецепторы к коллагену и фибрину, что и полноценные тромбоциты [160, 195, 223], таким образом, при контакте большого числа тромбоцитов с коллагеновыми матриксами часть их компонентов может закрепиться на субстрате независимо от самих тромбоцитов. Несмотря на высокую реактивность, тромбоциты адгезируют не на всех субстратах, включая биологические. Большое значение имеет не только химический состав субстрата, но также его плотность. На примере диплоидных клеток показано, что степень компактизации и конденсации коллагена, его топография значительно влияет на адгезию [119, 165, 172]. Следовательно, разные типы коллагеновых матрикс и, в частности, тканевые трансплантаты, должны иметь неодинаковую адгезивность для тромбоцитов человека. При этом необходимо исследовать саму топографию волокон в матриксе. Подбор адекватного коллагенового субстрата является принципиально важным для создания раневых покрытий, насыщенных тромбоцитами.

Таким образом, разработка и усовершенствование методик использования биологического потенциала тромбоцитов требует решения целого спектра задач – в области клеточной биологии, физиологии, морфологии, патологической анатомии, в различных областях медицины и инженерно-технической отрасли. Важным является изучить морфофункциональные и другие биологические особенности тромбоцитов, которые могут оказывать влияние на их биологическую активность и на реализацию их регенеративного потенциала.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательская работа проведена в течение 2015-2022 гг. в ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗ г. Москвы» на базе отделения биотехнологий и трансфузиологии, отделения консервирования тканей и производства трансплантатов и отделения экспериментальной патологии. Структура работы включала:

- Исследование нативных тромбоцитов и тромбоцитов после различных воздействий *in vitro*
- Оценку уровня секретируемых тромбоцитами биологически активных веществ *in vitro*
- Оценку *in vitro* структурной целостности, пролиферативной и миграционной активности диплоидных клеток человека в присутствии тромбоцитных препаратов, полученных разными способами
- Изучение *in vivo* влияния тромбоцитов на раневой процесс в модели ожога IIIa степени и глубокой механической раны у экспериментальных животных

### **2.1 Объекты исследования**

#### **2.1.1 Исследование тромбоцитов *in vitro***

В качестве источника тромбоцитов человека использовали венозную кровь доноров компонентов крови, консервированную с цитратом или ЭДТА; венозную кровь без консерванта, аферезные концентраты тромбоцитов (КТ), полученные с помощью аппаратов Cobe Trima и Trima Accel (Терумо ВСТ, США). В зависимости от цели исследования венозную кровь получали от:

- Доноров компонентов крови (n=320) – здоровые мужчины (n=164) и женщины (n=156). Биоматериал в объеме 5-30 мл получали во время плановой донации.

- Добровольцев (n=10) – здоровые мужчины и женщины (сотрудники ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»). Биоматериал в объеме 5-30 мл получали по мере необходимости. Все добровольцы были здоровыми и дали информированное согласие.

Для изучения биологических особенностей тромбоцитов, влияющих на скорость их функционального ответа, использовали образцы крови 200 доноров компонентов крови возрастом от 19 до 62 лет. В зависимости от возраста выделили 4 группы доноров: 19-29 лет (50 человек), 30-39 лет (50 человек), 40-49 лет (52 человека), 50 лет и старше (48 человек).

Для изучения активации тромбоцитов без добавления стандартных индукторов агрегации использовали образцы крови 40 доноров компонентов крови возрастом от 18 до 40 лет и образцы 30 аферезных КТ.

Для изучения стабилизации секреторных везикул в составе адгезирующих тромбоцитов использовали образцы крови 30 доноров компонентов крови возрастом от 25 до 50 лет и образцы 30 аферезных КТ.

Для изучения цитокинового состава биопрепаратов на основе тромбоцитов человека использовали крови 20 доноров компонентов крови возрастом от 25 до 50 лет, 10 добровольцев и образцы 20 аферезных КТ.

Для разработки способов получения тромбофибринового сгустка с высоким содержанием ростовых факторов использовали образцы 20 доноров компонентов крови возрастом от 25 до 50 лет и 10 добровольцев.

Для оценки рост-стимулирующих, репаративных и регенеративных свойства аппликативных биопрепаратов на основе тромбоцитов человека *in vitro* и *in vivo* использовали образцы 10 доноров компонентов крови возрастом от 25 до 50 лет и 10 добровольцев.

### **2.1.2 Исследование тканевых трансплантатов**

В работе использовали тканевые трансплантаты на основе кожи тканевых доноров (n=8), дермального матрикса (n=25), губчатой деминерализованной кости (n=12), твердой мозговой оболочки, ТМО (n=5), коллагеновые повязки на основе коллагена человека I типа (n=20) [18, 20, 82, 85]. Производство тканевых

трансплантатов проводили в отделении консервирования тканей и производства трансплантатов НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (заведующий – к.м.н. Миронов Александр Сергеевич). Работу с экспериментальными животными проводили в отделении экспериментальной патологии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (заведующая – профессор, д.б.н. Попова Тамара Сергеевна).

### **2.1.3. Исследования в культуре диплоидных клеток человека**

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 CO<sub>2</sub> 5%, при смене среды через каждые 3 суток. При культивировании клеток в 6-ти луночных планшетах исходное количество высеянных клеток составляло 50 тыс. на лунку, при культивировании клеток в 12-ти луночных планшетах – 10-20 тыс. на лунку. В зависимости от типа эксперимента культивирование клеток проводили в течение 3, 7 и 14 суток.

### **2.1.4. Исследования на экспериментальных животных *in vivo***

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). Возраст животных составлял 4-5 месяцев, вес – 25-30 г. На

30 особях, разделённых на 3 группы, исследовали регенерацию кожи после экспериментального ожога IIIa степени. В качестве раневых повязок применяли повязки на основе коллагена I типа. В контрольной группе использовали раневое покрытие без тромбоцитов (n=10), в 1 опытной группе повязка была насыщена БоТП с интактными тромбоцитами (n=10), во 2 опытной группе повязка была насыщена тромбоцитами, предварительно инкубированными с 2,5 мкМ наносеребра (n=10). Регенерацию тканей после глубокой механической раны исследовали на 45 особях, разделённых на 3 группы. В качестве раневого покрытия использовали дермальный матрикс (ДМ), приготовленный из кожи тканевых доноров. В контрольной группе использовали ДМ без тромбоцитов (n=15), в 1 опытной группе ДМ был насыщен БоТП с интактными тромбоцитами (n=15), во 2 опытной группе ДМ был насыщен тромбоцитами, предварительно инкубированными с 2,5 мкМ наносеребра (n=15). В наркоз животных вводили путём внутривентрального 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.

**Модель ожога IIIa степени** наносили стальной печаткой диаметром 12 мм, нагретой до 100°C. Время контакта печатки с кожей мышей в среднем составляло 5-6 секунд. Затем сухим тампоном удаляли некротизированный эпидермис, рану послойно укрывали раневым покрытием и марлевым тампоном, который фиксировали нитками к поливинилхлоридному кольцу [19].

**Модель глубокой раны** формировали путём иссечения кожи до фасции. После этого рану послойно укрывали раневым покрытием и марлевым тампоном, который фиксировали нитками к поливинилхлоридному кольцу.

**Вывод животных из эксперимента** проводили на 3 и 5 сутки в опытах по лечению поверхностного ожога и на 3, 14 и 21 сутки в опытах по лечению глубокой раны. На всех стадиях выводили по 5 особей в каждой группе. Вывод производили путём введения летальной дозы кетамина. После удаления повязки и поливинилхлоридного кольца производили полное иссечение раны с захватом

интактных тканей. Полученный материал фиксировали в 10%-ном растворе формалина.

## **2.2 Работа с тромбоцитами и компонентами крови**

### **2.2.1 Получение тромбоцитных препаратов**

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

- Плазма с тромбоцитами, полученная путем пассивной седиментации в вертикальном столбе жидкости (ПассПл)
- Богатая тромбоцитами плазма (БоТП) – суспензия тромбоцитов в плазме с концентрацией тромбоцитов более  $400 \cdot 10^9/\text{л}$  и 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  $100 \cdot 10^9/\text{л}$ , лейкоцитов – менее  $1,5 \cdot 10^9/\text{л}$
- Тромбоциты, отмытые от плазмы, (ОтмТр) – суспензия тромбоцитов в бесплазменной среде с той же концентрацией клеток, что и в БоТП
- Активированная богатая тромбоцитами плазма (актБоТП) – препарат на основе БоТП, полученный в результате активации плазмы хлоридом кальция
- Тромбоцитарный лизат (лизат тромбоцитов) – препарат, полученный в результате криодеструкции тромбоцитов. Для получения тромбоцитарного лизата могут быть использованы суспензии тромбоцитов как в плазме, так и в бесплазменной среде



Внутри одной серии экспериментов тромбоцитные препараты разных типов выделяли из общего образца крови.

Все процедуры, связанные с выделением и осаждением тромбоцитов, проводили на центрифуге Allegra 64R (Beckman Coulter, США) с установленной внутренней температурой. Из консервированной крови тромбоциты выделяли при 20-22°C, из неконсервированной крови – при 4-16°C. Сыворотку крови получали стандартным способом путем центрифугирования цельной неконсервированной крови доноров-добровольцев 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°C, с последующим отбором супернатантной плазмы.

**Базовая методика** получения БоТП включала два этапа:

- *Выделение плазмы с тромбоцитами.* Пробирки с исходной кровью, консервированной на цитрате или ЭДТА, центрифугировали 4-5 минут с ускорением 300-350 g. Затем отбирали супернатантную плазму с тромбоцитами. Полученную БоТП использовали для исследования морфофункционального статуса тромбоцитов и биологической активности тромбоцитов под действием разных факторов.
- *Концентрирование БоТП и выделение БедПл.* БоТП, выделенную при 300-350 g, переносили в новую стерильную центрифужную пробирку (тип Falcon) и центрифугировали 17 минут с ускорением 700 g, в результате чего на дне формировался осадок тромбоцитов. Из пробирки отбирали большую часть плазмы, бедной тромбоцитами (от 2/3 до 3/4 всего объема БедПл в пробирке), затем ресуспендировали осадок тромбоцитов в оставшемся объеме плазмы. Полученные образцы концентрированной БоТП и БедПл использовали для оценки биологической активности тромбоцитов, цитокинового состава тромбоцитов, оценки биологического потенциала тромбоцитных препаратов *in vitro* и *in vivo*.

Для получения ЛейкБоТП использовали *модифицированную базовую методику*:

- Пробирки с исходной кровью, консервированной на цитрате или ЭДТА, центрифугировали 5 минут с ускорением 300 g. Затем отбирали супернатантную плазму с тромбоцитами, одновременно захватывая фракцию лейкоцитов. Плазму с клетками вносили в новую стерильную центрифужную пробирку (тип Falcon) и центрифугировали 5 минут с ускорением 300 g. В результате центрифугирования на дне формировался осадок из лейкоцитов, тромбоциты оставались в суспензии.
- Всю плазму с тромбоцитами переносили во вторую центрифужную пробирку, которую помечали как «БоТП», перемешивали, а затем половину биоматериала возвращали в пробирку с осадком из лейкоцитов, которую помечали как «ЛейкБоТП». Осадок лейкоцитов ресуспендировали в плазме с тромбоцитами.
- Пробирки «БоТП» и «ЛейкБоТП» центрифугировали 17 минут с ускорением 700 g с целью осаждения всех клеток. Из обеих пробирок отбирали одинаковой объем бедной тромбоцитами плазмы (БедПл), затем ресуспендировали осадок клеток в оставшемся объеме БедПл.

В результате из одной пробы крови удавалось получить образцы концентрированной БоТП, БедПл и ЛейкБоТП.

Для получения ОтмТр проводили двухэтапное центрифугирование тромбоцитов с теми же режимами, как и при получении БоТП. После получения осадка тромбоцитов из образцов удаляли всю жидкую фракцию и вносили фосфатно-солевой раствор PBS с pH=7,3 (БиолоТ, Россия) или изотонический 0,9%-ного раствор хлорида натрия (БиолоТ, Россия) в объеме от 1/4 до 1/3 от всего объема забранной плазмы, проводили ресуспендирование осадка до полного исчезновения тромбоцитарных конгломератов.

Для получения активированной БоТП использовали 10%-ный раствор хлорида кальция (ДАЛЬХИМФАРМ, Россия). В 1 мл исходной БоТП вносили

40-60 мкл 10%-ного хлорида кальция, инкубировали БоТП в течение 20-30 мин при 37°C до формирования тромбоцитарного геля. После этого пробирку с гелем центрифугировали 20 минут с ускорением 3000 g и отбирали надосадок.

Для получения тромбоцитарных лизатов использовали БоТП, БедПл, ЛейкБоТП и ОтмТр. Криодеструкцию тромбоцитов проводили при температуре -40/-80°C, при этой же температуре образцы хранили и размораживали непосредственно перед исследованием. Разморозку проб проводили в медленном режиме при +2/+4°C в течение 12 часов, после этого пробы центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут с целью удаления всех клеточных фрагментов. Полученный супернатат представлял собой готовый препарат (тромбоцитарный лизат).

## **2.2.2. Исследование биологической активности тромбоцитов**

### **2.2.2.1 Изучение чувствительности тромбоцитов к АДФ**

У 100 доноров компонентов крови (50 мужчин и 50 женщин возрастом от 20 до 60 лет) исследовали чувствительность тромбоцитов к низким и средним дозам АДФ (0,5 мкМ, 1 мкМ, 2,5 мкМ). В работе с тромбоцитами использовали раствор 0,6 мг/мл адреналина для агрегометрии (Юнимед, Россия). Кровь доноров центрифугировали при 300-350 g в течение 5 мин с целью получения плазмы с тромбоцитами, проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов, затем образцы плазмы аликвотировали, вносили индуктор активации АДФ до конечной концентрации 0,5 мкМ, 1 мкМ или 2,5 мкМ, экспонировали при 37°C в течение 5 мин, после чего снова проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов.

### **2.2.2.2 Исследование ламеллообразования у тромбоцитов**

В работе использовали тромбоциты 80 доноров крови возрастом от 25 до 56 лет. Из всех образцов выделяли БоТП путем центрифугирования с ускорением 300 g в течение 5 минут. Для запуска адгезии 5-10 мкл БоТП наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и инкубировали

при 37°C с целью запуска адгезии. Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили через 5-10, 15, 30, 60 и 120 мин инкубации.

### **2.2.2.3 Исследование действия диметилсульфоксида**

В работе исследовали тромбоциты 20 кадровых доноров. Кровь доноров, консервированную на цитрате или ЭДТА, центрифугировали при 350 g в течение 4-5 мин при 22°C для получения богатой тромбоцитами плазмы. Образцы БоТП каждого донора аликвотировали, после чего в них вносили раствор 100% ДМСО (Helicon, Россия) до конечной концентрации 5%, 10%, 20%, 25%, 30% и 40% ДМСО и выдерживали при 22°C в течение 24 часов. Часть проб с 20-40% ДМСО дополнительно исследовали после 30-60 мин экспозиции при 37°C. Также исследовали эффект 20-40% ДМСО в БоТП, подвергшейся предварительной заморозке при -20/-40°C в течение 5 часов с целью криодеструкции всех тромбоцитов с гранулами. Проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов в суспензии и в составе тромбоцитарных агрегатов, также оценивали температуру образцов БоТП через 0,5-2 мин после внесения ДМСО. Для гистологического выявления фибрина использовали метод окрашивания метиловым фиолетовым по Вейгерту [62]. Уровень фибриногена в БоТП (г/л) определяли по методу Рутберг [63].

### **2.2.2.4 Исследование тромбоцитов при разной тоничности раствора**

Для исследования биологической активности тромбоцитов в условиях различной тоничности использовали 15 образцов аферезных КТ, выделенные путем автоматического афереза на сепараторе крови Trima Accel (Терумо БСТ, США). Для получения гипотонической среды образцы КТ смешивали с дистиллированной водой в отношении 3:1, 2:1 и 1:1, концентрация хлорида натрия в итоговой смеси составляла 0,11 М, 0,1 М и 0,075 М соответственно. Для получения гипертонической среды в образцы КТ вносили кристаллический хлорид натрия (Helicon, Россия) до конечной концентрации хлорида натрия

0,3М, 0,5М и 0,6М. Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили в течение 5-30 минут с момента изменения тоничности среды с тромбоцитами.

#### **2.2.2.5 Изучение влияния низкоимпульсного лазерного излучения на тромбоциты**

Исследовали тромбоциты 10 образцов КТ, полученные путем автоматического афереза на сепараторе крови Trima Accel (Терумо БСТ, США). Тромбоциты КТ окрашивали витальным флуорохромным красителем на основе трипавлафина и акридинового оранжевого [41], затем суспензию с витально окрашенными тромбоцитами в объеме 10-20 мкл наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом (толщина 0,2 мм), после чего *in situ* проводили низкоимпульсное облучение препарата с помощью лазерной установки в составе конфокального микроскопа «Nikon D-Eclipse C1» (Nikon, Япония) под объективом х4. Для облучения использовали модулированный ультрафиолетовый свет ( $\lambda=408$  нм, плотность мощности 40 мВт/см<sup>2</sup>, частота 150 Гц), голубой свет ( $\lambda=488$  нм, плотность мощности 20 мВт/см<sup>2</sup>, частота 80 Гц), зеленый свет ( $\lambda=543$  нм, плотность мощности 20 мВт/см<sup>2</sup>, частота 80 Гц) и красный свет ( $\lambda=637$  нм, плотность мощности 5, 10 и 20 мВт/см<sup>2</sup>, частота 80 Гц). Продолжительность облучения составляла от 0,5 до 60 мин.

#### **2.2.2.6 Активация тромбоцитов адреналином**

В работе с тромбоцитами использовали раствор адреналина 0,6 мг/мл для агрегометрии (Юнимед, Россия) и препарат для инъекций «Адреналина гидрохлорид-Виал» с концентрацией адреналина 1 мг/мл (Шаньдун Шэнлу Фармасьютикал Ко, Китай). Раствор адреналина для агрегометрии использовали для стимуляции дегрануляции тромбоцитов, стабилизированных разными способами на адгезивном субстрате. Препарат «Адреналина гидрохлорид-Виал» использовали в процессе разработки нового способа получения тромбоцитарного геля и тромбофибринового сгустка, насыщенного ростовыми факторами. В

опытах по изучению стабилизированных тромбоцитов конечная концентрация адреналина составила 5-10 мкМ, в опытах по получению тромбоцитарного геля – 0,5-1 мМ.

### **2.2.3 Стабилизация гранул тромбоцитов**

В процессе разработки способов стабилизации гранул в составе адгезирующих тромбоцитов использовали вещества, способные блокировать пути активации тромбоцитов. Стабилизацию тромбоцитарных гранул стимулировали следующими способами:

- **С помощью антиагреганта тикагрелора**

В работе использовали препарат тикагрелора «Брилинта» (Астразенека Индастриз, Россия). 1 таблетку препарата растворяли в 500 мл 0,9%-ного хлорида натрия при 37°C, полученный раствор повторно смешивали с фосфатным буфером PBS (рН=7,2-7,3) в соотношении 1:11, в результате получали раствор, содержащий 15 мг/л тикагрелора, который использовали в опытах по стабилизации тромбоцитов на субстрате. Для исследования влияния тикагрелора на рост ламеллы использовали растворы с концентрацией тикагрелора 5, 10, 15, 25, 30, 35, 50 и 100 мг/л в PBS. В качестве источника тромбоцитов человека использовали плазму, полученную из консервированной крови 15 доноров путем мягкого центрифугирования (5 мин при 350-400 g). Для исследования исходной адгезивной активности тромбоцитов образцы плазмы выдерживали при 37°C в течение 60 мин в присутствии адгезивных субстратов, после чего проводили морфофункциональный анализ. В качестве субстратов для адгезии тромбоцитов использовали фрагменты покровных стекол, стеклянные бусины диаметром 2-2,5 мм, коллагеновые повязки на основе коллагена I типа человека. Для исследования стабилизирующего действия тикагрелора во флакон с 1-2 мл плазмы вносили фрагмент субстрата площадью 0,5-1 см<sup>2</sup> и выдерживали пробу в термостате при 37°C в течение 5-7 минут с целью запуска адгезии. Затем, для стабилизации тромбоцитов с гранулами в пробы вносили раствор тикагрелора (на фосфатном буфере PBS, рН=7,2-7,3) до конечной концентрации

15 мг/л тикагрелора в пробе (опытные образцы), при этом часть проб оставляли без тикагрелора (контрольные образцы). Контрольные и опытные образцы с субстратами экспонировали при 37°C в течение 24 часов.

Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили в исходных пробах, в пробах через 10 мин и 1 час экспозиции с субстратом (без тикагрелора и в присутствии тикагрелора); кроме того, анализировали тромбоциты на поверхности используемых субстратов (без тикагрелора и в присутствии тикагрелора) через 10 мин, 1 час и 24 часа экспозиции.

- ***С помощью наночастиц серебра.***

В работе использовали 20 образцов КТ, полученных с помощью аппаратного афереза. В качестве источника коллоидных наночастиц серебра был выбран препарат «Ag-бион 2» («Наноиндустрия», Россия) с исходной концентрацией наночастиц 2,5 мМ. В работе с тромбоцитами использовали следующие концентрации наносеребра: 0,05 мкМ, 0,1 мкМ, 1 мкМ, 1,5 мкМ, 2,5 мкМ, 5 мкМ, 15 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ. Исходный препарат разводили фосфатным буфером PBS (0,15 М, pH = 7,2), а затем вносили разведенный раствор в образцы КТ для достижения необходимых концентраций наночастиц серебра. Было проведено две серии экспериментов. В 1-й серии исследовали морфофункциональные свойства тромбоцитов КТ после экспозиции с разными концентрациями наносеребра при 22°C и 37°C (предварительная инкубация тромбоцитов с наносеребром). Для этого образцы КТ объемом 0,1-1 мл инкубировали при 22°C и 37°C в течение 24 часов с разными концентрациями наночастиц серебра. Морфофункциональный анализ клеток проводили через 10-15 мин, 30 мин, 1 час, 2 часа, 4 часа и 24 часа после начала инкубации. Во 2-й серии экспериментов исследовали воздействие разных концентраций наносеребра на клетки, находящиеся на ранних стадиях адгезии, с целью изучить возможность сохранения гранул в составе адгезирующих тромбоцитов (стабилизация адгезирующих тромбоцитов наносеребром). Для этого 100-200 мкл КТ наносили на предметное стекло, помещенное в чашку Петри, инкубировали 10 минут при 37°C (для запуска адгезии тромбоцитов), затем

препарат вынимали, 3 раза промывали буфером PBS для удаления жидкой фракции с неадгезировавшими клетками, наносили 1 мл раствора с наночастицами (концентрация от 0,05 мкМ до 100 мкМ в буфере PBS) и помещали обратно в термостат на 37°C. Морфофункциональный анализ адгезировавших тромбоцитов проводили через 1 час, 2 часа и 24 часа после начала эксперимента.

- ***С помощью перекиси водорода***

В работе использовали 20 образцов КТ, полученных с помощью аппаратного афереза. До начала эксперимента тромбоцитные концентраты хранили при комнатной температуре и постоянном помешивании в течение 1-5 суток. В работе использовали 3%-ный раствор перекиси водорода (Heliquon, Россия). Проводили две серии экспериментов: в 1 серии исходный 3%-ный раствор перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) вносили в образцы БоТП, конечная концентрация  $H_2O_2$  в исследуемых пробах составила 20, 40, 50, 60, 80, 400 и 600 мкМ (для достижения концентраций 20-80 мкМ БоТП с перекисью водорода дополнительно разводили той же БоТП без перекиси до достижения необходимой концентрации  $H_2O_2$ ). Все пробы экспонировали при 22°C и 37°C в течение 2 часов. Кроме того, дополнительно проводили экспозицию проб с 20-80 мкМ  $H_2O_2$  в течение 1 часа при 37°C в присутствии адгезивного субстрата (предметное стекло), с целью оценить способность низких доз  $H_2O_2$  блокировать адгезию тромбоцитов и их дегрануляцию. Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили через 10, 20, 30, 60 и 120 минут.

Во 2 серии исследовали возможность стабилизации тромбоцитов путем предварительной инкубации с низкими дозами  $H_2O_2$ . Исходный 3%-ный раствор перекиси водорода разводили фосфатным буфером PBS (0,15 М, рН = 7,2) до достижения концентрации  $H_2O_2$  100 мкМ и затем смешивали с образцами БоТП в разных соотношениях. В опытных образцах БоТП конечная концентрация  $H_2O_2$  составляла 20 мкМ, 30 мкМ, 45 мкМ, 60 мкМ и 75 мкМ, в контрольные БоТП перекись водорода не вносили. Контрольные и опытные образцы экспонировали при 20-22°C в течение 24 часов. Морфофункциональный анализ клеток в



суспензии проводили через 5-10 мин, 30 мин, 1 час, 2 часа и 24 часа после начала инкубации. Для оценки адгезивных свойств тромбоцитов контрольные и опытные образцы в объеме 100-200 мкл наносили на предметное стекло, помещенное в чашку Петри, выдерживали при 37°C в течение 1-2 часов, после чего предметное стекло промывали буферным раствором PBS для удаления неадгезировавших клеток и исследовали морфофункциональные свойства тромбоцитов, адгезирующих на стекле. Кроме того, исследовали возможность повторной активации тромбоцитов, стабилизированных низкими дозами H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для этого тромбоциты после экспозиции на стекле в присутствии 45-60 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> обрабатывали раствором адреналина в конечной концентрации 5-10 мкМ, после чего оценивали содержание гранул и рост ламеллы в клетках.

- ***С помощью аскорбиновой кислоты.***

В работе использовали 10 образцов КТ, полученных с помощью аппаратного афереза. В работе использовали 5%-ный раствор аскорбиновой кислоты для инъекций (ДАЛЬХИМФАРМ, Россия). Аскорбиновую кислоту (АсК) вводили в плазму с тромбоцитами до конечной концентрации 0,1 мМ, 0,3 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ и 5 мМ, затем пробы экспонировали при 37°C в течение 5, 10, 15, 30, 60 и 120 мин. В процессе исследования оценивали содержание тромбоцитов с гранулами, в % (структурно и функционально полноценные клетки), адгезивную активность тромбоцитов и формирование ими ламеллы при адгезии на стекле и коллагене I типа, наличие и размер тромбоцитарных агрегатов.

#### **2.2.4 Получение насыщенных тромбоцитами коллагеновых матриц для оценки рост-стимулирующего действия тромбоцитных компонентов в культуре клеток**

В качестве коллагеновых матриц в работе использовали коллагеновые повязки, образцы дермального матрикса и губчатой деминерализованной кости (ГДК). Коллагеновые повязки получали на основе жидкого коллагена человека I типа, заготовленного у доноров тканей. Повязка представляет собой тонкий

слой коллагеновой губки, связанный с перфорированной подложкой кремнеорганической пленки карбосил-П [18]. В работе использовали матрицы с интактной БоТП, активированной БоТП, лизатом БоТП, БоТП с предварительно стабилизированными тромбоцитами, также осуществляли стабилизацию тромбоцитов непосредственно после начала их адгезии на коллагене.

#### **2.2.4.1 Коллагеновые матрицы с актБоТП и лизатом БоТП**

В работе использовали тромбоциты, выделенные из крови 12 доноров. Кровь, консервированную на цитрате или ЭДТА, центрифугировали при 350 g в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы. С помощью метода оценки морфофункционального статуса тромбоцитов [39] определяли общее содержание тромбоцитов с гранулами в образцах БоТП. БоТП разделяли на дозы по 100 млн тромбоцитов с гранулами. В работе использовали неактивированную БоТП, БоТП, активированную 10%-ным хлоридом кальция, и лизат БоТП. Фрагменты коллагеновых повязок, дермального матрикса и ГДК площадью 1-2 см<sup>2</sup> помещали на дно 6-ти луночных культуральных флаконов, наносили на них подготовленные дозы актБоТП и лизата БоТП, после чего осуществляли посев клеток (100 тысяч на лунку). В работе использовали культуру фибробластов кожи кадавера. Морфофункциональный анализ клеток в культуре проводили через 1, 3 и 7 суток с момента посева. В образцах актБоТП и лизатов БоТП оценивали содержание тромбоцитарного ростового фактора PDGF-BB с помощью набора реагентов «Qantikine, Human PDGF-BB Immunoassay» фирмы «R & D Systems» и системы «Multiskan ascent» фирмы «Thermo».

#### **2.2.4.2 Повязки со стабилизированными и нестабилизированными тромбоцитами**

Для изготовления раневых покрытий использовали коллагеновые повязки площадью 4-5 см<sup>2</sup> и образцы БоТП объемом 0,5 мл. В качестве источника тромбоцитов использовали кровь доноров-добровольцев, консервированную на ЭДТА. Образцы крови подвергали двухэтапному центрифугированию при 300 g и 700 g для получения БоТП с концентрацией тромбоцитов выше 1000\*10<sup>9</sup>/л. В работе использовали повязки без тромбоцитов (контроль), повязки с нативными

(нестабилизированными) тромбоцитами, повязки с тромбоцитами, стабилизированными с помощью наночастиц серебра. Для стабилизации тромбоцитов использовали препарат с коллоидными наночастицами серебра «Ag-бион 2» («Наноиндустрия», Россия). Исходный препарат разводили 0,9% хлоридом натрия для получения раствора с концентрацией наносеребра 15 мкМ. Насыщение повязок тромбоцитами использовали следующие подходы:

1. Для насыщения повязок нативными (нестабилизированными) тромбоцитами суспензию клеток в БоТП наносили на коллагеновую повязку и инкубировали 30 минут при 37°C.
2. Для стабилизации тромбоцитов путем предварительной инкубации с наночастицами серебра в исходную БоТП добавляли раствор с 15 мкМ наносеребра на фосфатно-солевом буфере PBS (pH=7,2-7,3), конечная концентрации наносеребра в БоТП составляла 2,5 мкМ. БоТП с наносеребром инкубировали 1 час при 22°C, затем наносили на коллагеновую повязку и инкубировали 30 минут при 37°C.
3. Для стабилизации тромбоцитов на ранней стадии адгезии образцы БоТП сначала наносили на повязку и инкубировали 10 минут при 37°C, затем к ней добавляли раствор 15 мкМ наносеребра на фосфатно-солевом буфере PBS (pH=7,2-7,3) до достижения конечной концентрации 5 мкМ наносеребра и инкубировали еще 30 минут при 37°C.

После инкубации тромбоцитов на коллагеновых повязках из лунок удаляли всю жидкую фракцию с неадгезировавшими тромбоцитами. Готовые повязки хранили при -40°C и размораживали непосредственно перед посевом клеток.

### **2.2.5 Получение раневых покрытий с тромбоцитами при исследовании репаративного действия БоТП *in vivo***

В качестве исходных раневых покрытий использовали повязки на основе коллагена I типа человека и образцы дермального матрикса. Во всех случаях площадь раневого покрытия составляла 1 см<sup>2</sup>. Повязки на основе коллагена

I типа человека применяли в опытах по лечению поверхностных ран, дермальный матрикс – в опытах по лечению глубоких ран. В работе использовали следующие типы раневых покрытий: покрытия без тромбоцитов (контроль); покрытия с нативными (нестабилизованными) тромбоцитами (1-я опытная группа); покрытия с тромбоцитами, стабилизированными с помощью наночастиц серебра (2-я опытная группа). В качестве источника тромбоцитов использовали кровь доноров-добровольцев, консервированную на ЭДТА. Образцы крови подвергали двухэтапному центрифугированию при 300 g и 700 g для получения БотП с концентрацией тромбоцитов выше  $1000 \cdot 10^9/\text{л}$ . Для стабилизации тромбоцитов в исходную суспензию с тромбоцитами предварительно добавляли раствор наносеребра «Ag-Бион2» («Наноиндустрия», Россия) до достижения концентрации наносеребра 2,5 мкМ и инкубировали при 22°C в течение 1 часа. Во всех опытах общий объем суспензии тромбоцитов, нанесенных на покрытия, составлял 150 мкл. Образцы дермального матрикса перед нанесением тромбоцитов предварительно выдерживали в 0,9%-ном растворе хлорида натрия (БиолоТ, Россия) в течение 1 часа. После нанесения БотП раневые покрытия инкубировали в течение 30 мин при 37°C, затем удаляли всю жидкую фракцию с неадгезировавшими тромбоцитами. Готовые раневые покрытия хранили при -40°C и размораживали перед экспериментом.

### **2.3 Макроскопическая оценка раны в исследовании на животных**

Макроскопический анализ раны проводили при изучении влияния насыщенных тромбоцитами биологических покрытий на раневой процесс *in vivo*. После вывода животных из эксперимента удаляли повязку и поливинилхлоридное кольцо и получали цифровые фотографии общего вида раны. Рану макроскопически оценивали по следующим критериям:

1. Наличие и выраженность признаков воспаления
2. Наличие отека
3. Наличие и выраженность признаков эпителизации
4. Восстановление волосяного покрова

## 2.4 Лабораторные методы исследования

### 2.4.1 Исследование тромбоцитов

*Общее количество клеток в крови и в плазме* оценивали с помощью стандартного гематологического анализатора AcTdiff 2 (фирма “Beckman Coulter”, США) в автоматическом режиме. Результат выражали в количестве клеток на единицу объема (тыс/мкл или  $10^9/\text{л}$ ).

*Морфофункциональный анализ тромбоцитов* проводили с помощью оригинального метода, включающим окрашивание клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями на основе трипафлавина и акридинового оранжевого с последующим их анализом во флуоресцентном микроскопе [39, 41].

Во всех исследованиях определяли следующие параметры:

- содержание тромбоцитов с гранулами, относительное, Дтр.гр. (%) и абсолютное, Стр.гр. (тыс/мкл или  $10^9/\text{л}$ )
- морфофункциональная активность тромбоцитов, МФАТ (в баллах). МФАТ отражает структурную целостность тромбоцитов и насыщенность их гранулами. Для оценки МФАТ получали цифровые изображения 150-200 клеток и оценивали средний уровень  $\text{МФАТ}_{\text{опыт}}$  (в баллах) на клетку.
- адгезивная активность тромбоцитов (ААТ) на стекле (в баллах). ААТ отражает уровень тромбоцитов, способных к активному функционированию. Для оценки ААТ получали цифровые изображения 150-200 клеток и оценивали долю (%) адгезировавших тромбоцитов к общему числу обследованных тромбоцитов. 1% равен 1 баллу ААТ.
- морфофункциональный статус тромбоцитов, МФСТ (в баллах). МФСТ является интегральной характеристикой тромбоцитов, отражает их структурную целостность и функциональную активность. МФСТ определяется как сумма МФАТ и ААТ и выражается в баллах.

Дополнительно при исследовании тромбоцитов определяли:

- долю тромбоцитов, богатых гранулами, ТБГ, в % (клетки с яркостью свечения 60 и более фут-кандел при витальном окрашивании, наиболее жизнеспособные тромбоциты [41]);
- долю тромбоцитов с гранулами, контактирующих со стеклом без выброса гранул (%);
- долю клеток с выраженной ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов, в % (отражает способность разных концентраций веществ подавлять распластывание тромбоцитов на субстрате);
- долю адгезировавших тромбоцитов, содержащих более 3 визуально различимых гранул диаметром 400 нм и более, % (отражает число клеток, не претерпевших необратимой активации в процессе адгезии);
- среднюю яркость цитоплазмы тромбоцитов без выраженных нарушений мембран, Яцит (фут-кандел);
- сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах,  $S_{x_{гр}}$  (%). Значение МФАТ каждого тромбоцита складывается из яркости цитоплазмы (Яцит) и яркости гранул. В тромбоцитах с гранулами среднее значение яркости в среднем равно 70 баллам, т.о. вклад самих гранул в общее свечение клетки рассчитывается как разность 70 и Яцит. Сохранность гранул в тромбоцитах (%) рассчитывают по формуле:  $S_{x_{гр}} = (MFA_{T_{опыт}} - Яцит) : (70 - Яцит) \times 100\%$ . При  $MFA_{T_{опыт}} = 70$  баллов значение  $S_{x_{гр}}$  составляет 100% (в клетке сохраняется весь объем гранул), при  $MFA_{T} = Яцит$  баллов значение  $S_{x_{гр}}$  составляет 0% (все гранулы вышли из клетки);
- наличие и размер тромбоцитарных агрегатов при воздействии активирующих и стабилизирующих факторов.
- адгезия тромбоцитов на тканевых трансплантатах. На дно чашек Петри диаметром 3,5 см помещали фрагменты тканевых трансплантатов размером 1x1 см, вносили 2 мл БотП или КТ, инкубировали при 37°C в

течение 0,5-1 часа, после этого проводили морфофункциональный анализ тромбоцитов на поверхности трансплантатов.

- коэффициент чувствительности тромбоцитов к низким дозам АДФ,  $KЧ_{адф}$  (%). В исходных образцах БоТП определяли содержание тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр.1), затем БоТП разделяли на 3 равные аликвоты и в каждую из них вносили индуктор активации АДФ в концентрации 0,5 мкМ, 1 мкМ или 2,5 мкМ. Затем БоТП инкубировали при 37°C в течение 5 мин, повторно определяли содержание неактивированных тромбоцитов с гранулами (Дтр.гр.2) и рассчитывали коэффициент чувствительности тромбоцитов к АДФ ( $KЧ_{адф}$ ) по формуле:  $KЧ_{адф} = (Дтр.гр.1 - Дтр.гр.2) : Дтр.гр.1 \times 100\%$ . Параметр  $KЧ_{адф}$  показывает долю функционально пригодных клеток, необратимо активируемых под действием заданной дозы АДФ.

***Оценка содержания тромбоцитов с гранулами в составе раневых покрытий, предназначенных для опытов in vitro и in vivo.***

Количество тромбоцитов с гранулами в составе раневых покрытий определяли по разности общего содержания тромбоцитов с гранулами в дозах БоТП до и после контакта с раневым покрытием. Для этого оценивали общий объем образцов БоТП, не адсорбированной коллагеном, определяли в них уровень Дтр.гр. и рассчитывали общее содержание тромбоцитов с гранулами (млн) в БоТП до и после экспозиции.

В опытах по исследованию рост-стимулирующего эффекта БоТП in vitro общее количество тромбоцитов с гранулами в составе коллагеновых повязок варьировало от 10 до 225 млн. В опытах по исследованию репаративного действия БоТП in vivo общее количество тромбоцитов с гранулами в составе коллагеновых повязок составило 30 млн, в составе образцов дермального матрикса – 28 млн.

#### 2.4.2 Морфофункциональный анализ диплоидных клеток в культуре

Оценку жизнеспособности диплоидных клеток человека в культуре проводили с помощью оригинальных методов, основанных на витальном окрашивании клеток и их исследовании во флуоресцентном микроскопе [37, 41]. Для окраски клеток использовали витальные флуорохромные красители трипафлавин-акридиновый оранжевый и трипафлавин-родамин С. Оценивали содержание клеток на дне лунки и на поверхности тканевых трансплантатов (тыс/см<sup>2</sup>), индекс пролиферации на 3 сутки, ИП<sub>3</sub>(отношение числа клеток через 3 суток к числу клеток через 1 сутки культивирования), общую морфологию клеток, наличие секреторных везикул в клетках, целостность клеточных мембран, ЦКМ (в баллах). В норме ЦКМ диплоидных клеток человека составляет 28-42 балла [38]. Параллельно оценивали интенсивность миграции клеток внутрь тканевых трансплантатов, а также их рост на обратной стороне тканевых трансплантатов.

#### 2.4.3 Редоксиметрия

Измерение редокс-потенциала в среде БоТП проводили на гладком поликристаллическом платиновом электроде площадью  $3,3 \cdot 10^{-2}$  см<sup>2</sup> с помощью потенциостата IPC Compact (НПО «Вольта», Россия), насыщенный хлоридсеребряный электрод использовался в качестве сравнения. Величину редокс-потенциала определяли как потенциал электрода при разомкнутой цепи через 15 мин экспозиции. Перед каждым измерением платиновый электрод подвергался обработке 0,14 М раствором дисульфита натрия [3]. Результат выражали в милливольтках (мВ).

Для смещения редокс-потенциала в сторону положительных значений использовали низкие концентрации персульфата натрия Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (AG TermoPasty, Польша). В исследуемых образцах БоТП концентрация (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) варьировала от 10<sup>-5</sup> до 10<sup>-3</sup>М. Для смещения редокс-потенциала в сторону отрицательных значений использовали восстановитель сульфит натрия Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>



(AG TermoPasty, Польша), в исследуемых образцах концентрация  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  варьировала от  $10^{-5}$  до  $10^{-3}\text{M}$ .

#### **2.4.4 Оценка цитокинового состава тромбоцитных препаратов**

Исследование 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. В тромбоцитных препаратах определяли концентрацию тромбоцитарного фактора роста PDGF, фактора роста фибробластов FGF-2, фактора роста эндотелия EGF, трансформирующего фактора роста TGF- $\alpha$ , фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$ , интерлейкинов 1 (IL-1 $\alpha$ ), 6 (IL 6), 8 (IL 8), фактора роста эндотелия сосудов VEGF. Результат выражали в пг/мл.

#### **2.4.5 Микроскопия**

В работе использовали конфокальный микроскоп «Nikon Eclipse 80i», совмещенный с флуоресцентной лампой «Nikon Intesilight C-HGF $\alpha$ » (Nikon Corporation, Япония). Для получения флуоресцентного изображения окрашенных тромбоцитов и диплоидных клеток человека использовали синий светофильтр с  $\lambda$ возбуждения 450-490 нм,  $\lambda$ эмиссии – от 520 нм, время экспозиции 0,25-1 с. Для оценки автофлуоресценции коллагена в гистологических препаратах использовали зеленый светофильтр ( $\lambda$ возбуждения – 510-560 нм,  $\lambda$  эмиссии – от 575 нм, время экспозиции – 1 с). Для количественной характеристики автофлуоресценции коллагеновых волокон использовали параметр средней интенсивности свечения (mean fluorescence activity, MFI<sub>кол</sub>). Полученные цифровые фотографии переносили в программу Adobe Photoshop 8, выделяли отдельные изображения клеток и коллагеновых волокон и определяли интенсивность их флуоресценции в фут-канделах. При оценке структурной целостности тромбоцитов и диплоидных клеток 1 фут-кандел соответствует 1 баллу МФАТ и 1 баллу ЦКМ [39, 41].

#### **2.4.6 Гистологическое исследование**

После вывода из эксперимента у животных скальпелем иссекали рану с захватом подлежащих и окружающих тканей. Полученный материал фиксировали 10%-ным раствором формалина. Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике, окрашивали гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. В проходящем свете оценивали наличие струпа, островковой и краевой эпителизации, плотность инфильтрации тканей клетками воспаления (клеток/мм<sup>2</sup>), плотность новообразованных сосудов (число фрагментов сосудов на 1 мм<sup>2</sup>), интенсивность автофлуоресценции коллагеновых волокон (фут-кандел), миграцию фибробластов в область раны, формирование дериватов кожи.

#### **2.5 Статистический анализ**

Полученные статистические данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ «IBM SPSS Statistics 22». Вычисляли среднее значение (M), среднеквадратичное отклонение ( $\sigma$ ), 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% ( $p < 0,05$ ).

## ГЛАВА 3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРОМБОЦИТОВ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТВЕТА

### **3.1 Характеристика морфофункционального статуса тромбоцитов в разных гендерно-возрастных группах**

Многочисленные исследования в области гематологии и трансфузиологии показывают, что у здоровых людей функциональная активность тромбоцитов может значительно варьировать [10, 22, 41, 81]. Скорость функционального ответа тромбоцитов напрямую связана с реализацией ими биологического потенциала, поэтому важным было исследовать качество тромбоцитов у разных групп доноров. В данной работе были обследованы образцы крови, заготовленные как у кадровых доноров (n=198), так и у первичных доноров (n=122). 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. Так, в 20% случаев в обеих группах выявлялись доноры с невысоким уровнем функционально полноценных тромбоцитов с гранулами Dтр.гр. (от 35 до 42%). При этом нужно подчеркнуть, что эти данные не учитывают гендерно-возрастных характеристик. Есть мнение, что возраст человека значительно влияет на активность его тромбоцитов [10, 46]. Показано, что у женщин пожилого возраста заметно возрастает риск спонтанной активации тромбоцитов [26, 81, 130]. Однако наше исследование не выявило корреляции между возрастом донора и его морфофункциональными параметрами. Среди доноров-мужчин все возрастные группы имели сходные значения Dтр.гр. и МФСТ (табл. 2), однако стоит отметить повышенную вариабельность Dтр.гр. у доноров до 29 лет – в данной группе значения этого параметра, близкие к

нижнему и верхнему пределу нормы (35-36 баллов и 74-75 баллов) встречались в среднем в 1,5 раза чаще, чем в остальных группах. У доноров-женщин содержание тромбоцитов с гранулами в группе от 40 до 49 лет было достоверно ниже по сравнению с остальными возрастными группами ( $p < 0,05$ ). Аналогичный этому эффект у женщин выявлен при анализе МФСТ. Это может быть связано как с гормональными перестройками у женщин от 40 до 49 лет, так и с изменением реактивности тромбоцитов. Во всех возрастных группах средние значения морфофункциональных параметров тромбоцитов у женщин-доноров были выше, чем у мужчин, однако эти различия были недостоверными. В связи с этим в последующих экспериментальных исследованиях работа проводилась без учета гендерно-возрастной принадлежности донора.

Таблица 2 – Морфофункциональные параметры тромбоцитов в крови доноров с учетом гендерно-возрастных характеристик

Пол доноров	Возрастные группы доноров			
	19-29 лет	30-39 лет	40-49 лет	≥50 лет
Содержание тромбоцитов с гранулами, % (Me [25%; 75%])				
мужчины	50 [42; 63] n=25	54 [48; 58] n=25	53 [47; 56] n=26	54 [46; 56] n=24
женщины	65 [63;69] n=25	63 [55;65] n=25	55 [46; 58]* n=26	64 [54; 68] n=24
Морфофункциональный статус тромбоцитов, баллы (Me [25%; 75%])				
мужчины	103 [95; 112] n=25	105 [96; 110] n=25	102 [96; 105] n=26	103 [97; 105] n=24
женщины	121[114; 126] n=25	118[107; 125] n=25	105[99; 112]* n=26	118[107; 125] n=24
*относительно доноров-женщин других возрастных групп при $p < 0,05$ (критерий Краскела-Уоллиса)				

Приводимое разными источниками различие между мужчинами и женщинами по активности тромбоцитов [21-23, 81] может быть, в том числе, обусловлено их неодинаковой чувствительностью к индукторам активации. По данным литературы, в присутствии сильных индукторов активации – коллагена или высоких доз АДФ (5-10 мкМ) – у всех здоровых людей происходит тотальная необратимая активация тромбоцитов с гранулами, которая сопровождается дегрануляцией и образованием тромбоцитарных агрегатов [36, 91]; следовательно, различие в чувствительности тромбоцитов следует искать при более низких дозах индуктора. В настоящей работе оценивали уровень Dтр.гр. в БотП доноров до и после экспозиции с 0,5 мкМ, 1 мкМ и 2,5 мкМ АДФ. Среди обследованных доноров у 88% мужчин и 90% женщин отмечена низкая чувствительность тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ, значение  $KЧ_{адф}$  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,  $KЧ_{адф}$  варьировал от 40 до 80%. Среди доноров с низкой чувствительностью тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ среднее значение  $KЧ_{адф}$  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  $KЧ_{адф}$  среди мужчин и женщин не отмечено. В опытах с 1 мкМ АДФ значение  $KЧ_{адф}$  составляло 62[58;65]% у мужчин и 60 [57;66]% у женщин, в опыте с 2,5 мкМ АДФ – 85[82;86]% и 84 [82;85]% соответственно. Ранее нами показано, что под действием 0,5 мкМ АДФ в плазме *in vitro* могут формировать крупные тромбоцитарные конгломераты, которые затем распадаются, большая часть клеток, образующих конгломерат, не дегранулирует [41]. С другой стороны, тесный контакт тромбоцитов может быть триггером, запускающим их

необратимую активацию [266; 308]. В связи с этим необходимо дополнительно исследовать морфофункциональные характеристики тромбоцитов, влияющие на скорость их функционального ответа.

### **3.2 Морфофункциональный анализ роста ламеллы тромбоцитов**

При контакте с адгезивным субстратом в тромбоцитах человека происходит активная реорганизация элементов цитоскелета. В процессе адгезии тромбоциты способны формировать обширную ламеллу по всему периметру клетки [104-106, 209]. Ламелла значительно расширяет площадь контакта тромбоцитов с субстратом и с другими тромбоцитами, что ускоряет их активацию и образование агрегатов [36, 91]. Таким образом, рост ламеллы влияет на интенсивность функционального ответа всей популяции тромбоцитов. Неспособность тромбоцитов к образованию ламеллы наблюдается как в результате их повреждения, так и в случае их инактивации на фоне нормальной структурной целостности [29, 40, 281]. С другой стороны, гиперактивация тромбоцитов может происходить без активного роста ламеллы [44, 61, 181]. Есть данные, что интенсивный рост ламеллы препятствует дегрануляции тромбоцитов, т.е. их переходу в необратимо активированное состояние [112, 191]. Благодаря сканирующей электронной микроскопии можно отчетливо видеть, что тромбоциты из одной и той же крови по-разному контактируют с субстратом, имеют неодинаковое число псевдоподий и ламеллоподий через равные промежутки времени [123, 127]. Этот эффект связывают со стимуляцией или подавлением внутриклеточных сигнальных путей, с типом субстрата, не учитывая морфофункциональные различия тромбоцитов. Стоит подчеркнуть, что в тромбоцитарной популяции неоднородность наблюдается даже среди клеток, имеющих интактную дисковидную форму (дискоцитов). Дискоциты различаются не только по линейным размерам, но также по насыщенности гранулами, с разной интенсивностью участвуют в функциональном ответе [38-41]. Можно предположить, что интенсивность роста ламеллы также может отражать особенности морфофункционального статуса тромбоцитов.

В крови доноров доля тромбоцитов с гранулами составила 52% [43;58], доля больших округлых тромбоцитов – 20% [18; 21]. В литературе описана повышенная склонность больших округлых тромбоцитов к спонтанной активации и быстрой адгезии [167, 296]. Однако при исследовании адгезии тромбоцитов на стекле скорость роста ламеллы не зависела от исходных размеров тромбоцита.

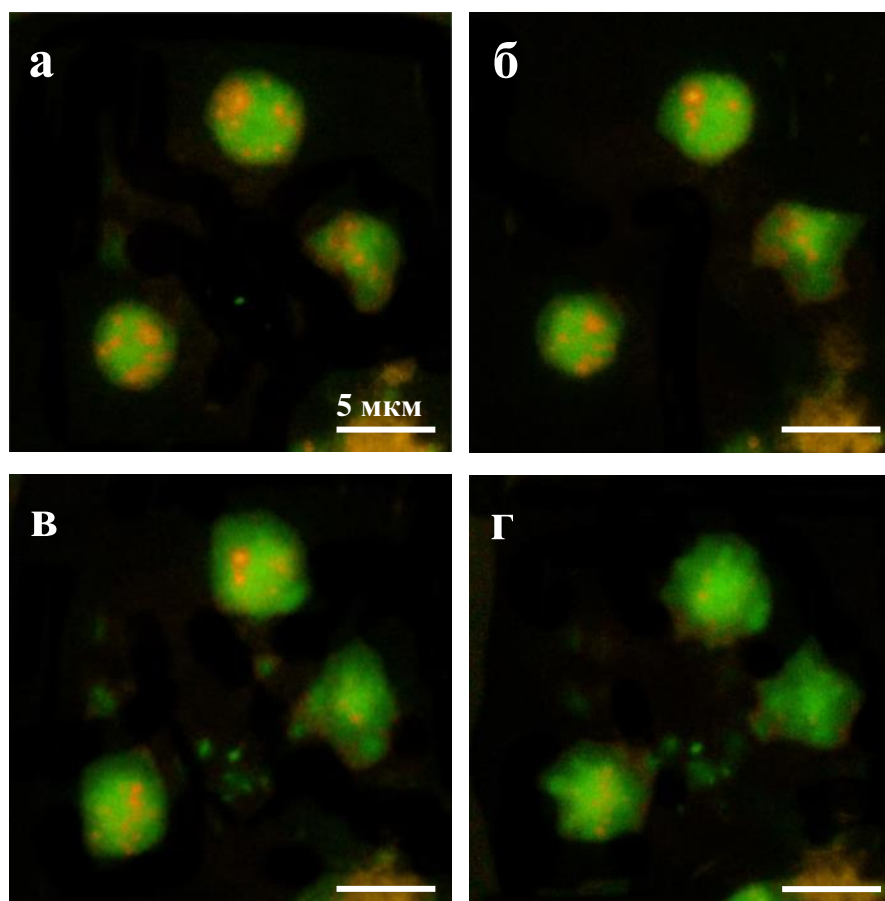


Рисунок 10 – Адгезия тромбоцитов доноров на стекле при 37°C. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым.

а – через 5 минут контакта со стеклом (смещение гранул к периферии тромбоцита); б – через 10 мин (начало дегрануляции); в – через 15 минут (формирование ламеллоподий); г – через 30 мин (полная дегрануляция).

Смещение гранул и образование выростов цитоплазмы в нормальных тромбоцитах начинается через 5-10 мин с момента контакта с предметным стеклом при 37°C (рис. 10а,б). При этом псевдоподии и ламеллоподии нередко формировались уже после выхода части гранул за пределы тромбоцитов (рис.

10в). Через 30 мин адгезии тромбоциты доноров выбрасывали практически весь объем гранул, их псевдоподии и ламеллоподии были отчетливо видны при витальном окрашивании (рис. 10г).

Размер и количество цитоплазматических выростов заметно отличались у разных клеток. 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. 11А); 2-й тип – тромбоциты, образующие ламеллу на определенном участке клетки, но не по всему периметру (рис. 11Б); 3-й тип – тромбоциты с выраженной, очень широкой ламеллой, охватывающей весь периметр клетки (рис. 11В).

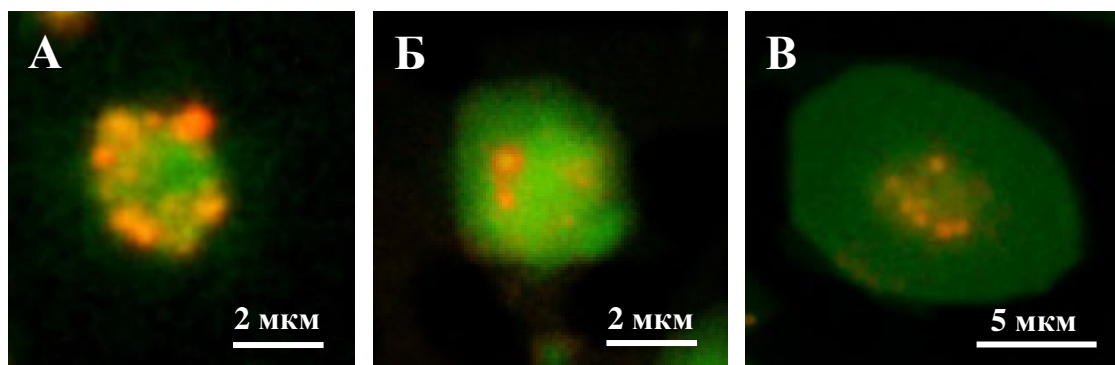


Рисунок 11 – Разная интенсивность роста ламеллы в адгезирующих тромбоцитах человека после 10-15 минут контакта со стеклом. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым.

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

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. 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. В крови доноров адгезирующие тромбоциты 1-го типа выделяли все гранулы в течение 12-18 минут с момента контакта со стеклом на фоне отсутствия роста ламеллы. У 70% обследованных доноров доля таких клеток среди всех адгезирующих тромбоцитов варьировала от 8 до 13%, у 20% – от 14 до 20%, у 5% - от 21 до 30%, у 5% - от 31 до 40%. Была выявлена тесная корреляция между содержанием тромбоцитов 1-го типа и значением  $KЧ_{адф}$  при 0,5 мкМ АДФ ( $r=0,822$ ,  $p=0,000$ , рис. 12).

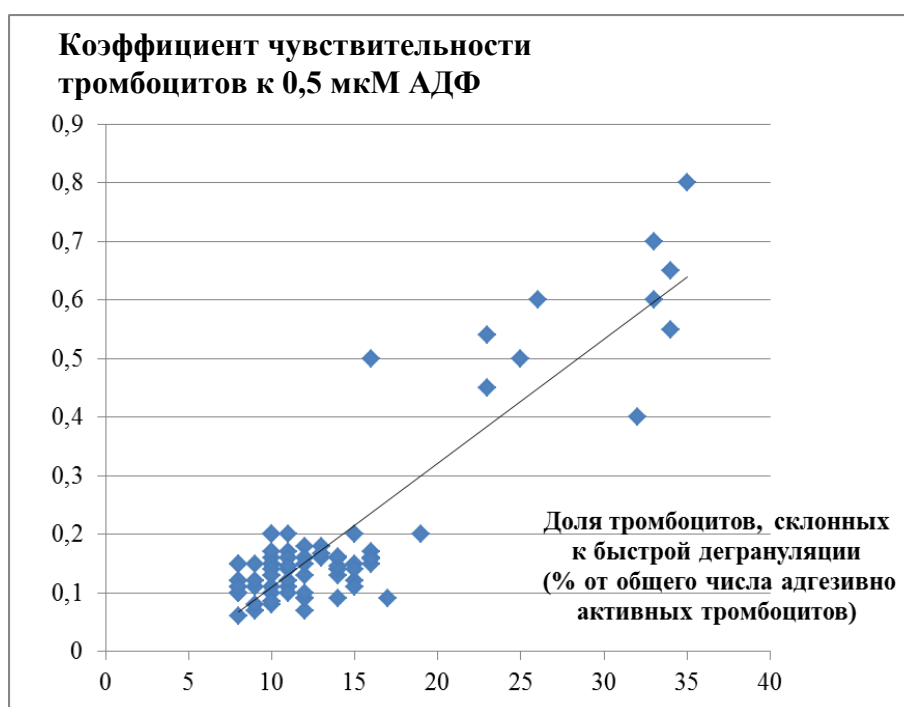


Рисунок 12 – Взаимосвязь доли тромбоцитов, склонных к быстрой адгезии и дегрануляции, с чувствительностью тромбоцитов к 0,5 мкМ АДФ.

Можно заключить, что, по крайней мере, одной из причинной высокой чувствительности тромбоцитарного пула к низким дозам АДФ являются именно тромбоциты, склонные к быстрой дегрануляции без роста ламеллы. Наличие в БоТП большого пула высокочувствительных клеток может быть создавать трудности при производстве тромбоцитных препаратов; с другой стороны, в определенных случаях повышенная реактивность тромбоцитов может усиливать реализацию их биологического и репаративного потенциала. Это еще раз подтверждает необходимость морфофункционального исследования тромбоцитов в процессе их использования в регенеративной медицине.

### **3.3 Морфофункциональные особенности тромбоцитов без гранул**

Анализ большого числа доноров показал, что в крови здоровых людей постоянно присутствуют тромбоциты дисковидной формы, не содержащие гранул, а также тромбоциты с малым числом гранул, которые зачастую тесно связаны с периферией тромбоцита. Такие клетки имеют дисковидную или близкую к ней форму, имеют нормальную яркость цитоплазмы, не являются дегенеративными или необратимо активированными. Такие клетки совершенно не экспрессируют Р-селектин – стандартный маркер активации тромбоцитов [194, 213]. Исследование крови доноров выявило устойчивую корреляцию между содержанием тромбоцитов, насыщенных гранулами, и содержанием тромбоцитов с 1-2 гранулами ( $r=0,702$ ,  $p=0,006$ ). Весьма вероятно, что дисковидные тромбоциты с 1-2 гранулами относятся к особому типу / пулу тромбоцитов, который осуществляет конститутивный экзоцитоз (выброс секреторных везикул). В результате в циркулирующей крови выявляются тромбоциты, содержащие лишь остаточный объем гранул. Можно предположить, что определенная часть тромбоцитов с гранулами постоянно переходит к конститутивному экзоцитозу без необратимой активации. С другой стороны, сокращение гранул в тромбоцитах также может быть вызвано их старением. Безусловно, изучение жизненного цикла тромбоцитов представляет

важную фундаментальную и практическую задачу, и требует детальных исследований.

Для жизнедеятельности любых клеток большое значение имеет структурная целостность их мембранных компонентов. Благодаря витальному окрашиванию появляется возможность оценить качество тромбоцитарных мембран на основе интенсивности их свечения. У биологически полноценных тромбоцитов с гранулами уровень свечения цитоплазмы (отдельно от гранул) обычно составляет от 20 до 30 фут-кандел; это значение отмечается также у подавляющего большинства тромбоцитов с 1-2 гранулами и тромбоцитов без гранул (рис. 13б,в). Однако, среди дисковидных тромбоцитов без гранул встречается группа клеток, где уровень свечения цитоплазмы гораздо ниже нормы (рис. 13г), в среднем составляя 12-13 фут-кандел; стоит особо подчеркнуть, что заметное снижение яркости цитоплазмы при витальном окрашивании всегда наблюдается у дегенеративных форм тромбоцитов, т.е. у разрушенных или разрушающихся клеток. В цельной крови доноров дискоциты с низким уровнем свечения цитоплазмы обычно составляют не более 10-11% от всего пула тромбоцитов без гранул, а в пересчете на всю популяцию тромбоцитов – не более 2-3%. Вместе с тем, в процессе короткого хранения КТ при 20-22°C число дискоцитов с дефектами мембран начинает возрастать, особенно заметно – через 2-3 суток хранения, а через 5 суток почти все дисковидные тромбоциты имели очень низкую яркость цитоплазмы при витальном окрашивании. Очевидно, это является результатом массового повреждения тромбоцитов в условиях короткого хранения. При хранении плазмы на шейкере при 20-22°C через 1-2 суток у 70% доноров выявлялись тромбоциты веретеновидной формы, с характерными сужениями цитоплазмы с двух сторон, диаметр веретеновидных тромбоцитов варьировал от 3 до 6 мкм. Доля веретеновидных тромбоцитов в плазме доноров через 1 сутки хранения составляла в среднем 9 [5;12]% через 2 суток – 12 [6;15]%, различие между 1 и 2 сутками было недостоверным ( $p > 0,05$ ). Через 3 суток уровень веретеновидных тромбоцитов резко возрастал и составил 32 [30;33]%. В течение 1-2 суток

хранения яркость цитоплазмы веретеновидных тромбоцитов соответствовала норме, на 3-5 сутки яркость цитоплазмы ВерТр была в 1.3 раза ниже по сравнению с 1-2 сутками ( $p < 0,05$ ), что говорит о деформации мембранных структур таких тромбоцитов. Во всех обследованных образцах плазмы доноров веретеновидные тромбоциты не содержали гранул или содержали 1-2 гранулы, связанные с клеточной границей (рис. 14). Веретеновидные тромбоциты не проявляли способности к активной адгезии на стекле, однако могли контактировать с уплощенными агрегатами, образованными в результате адгезии нормальных тромбоцитов (рис. 14Б).

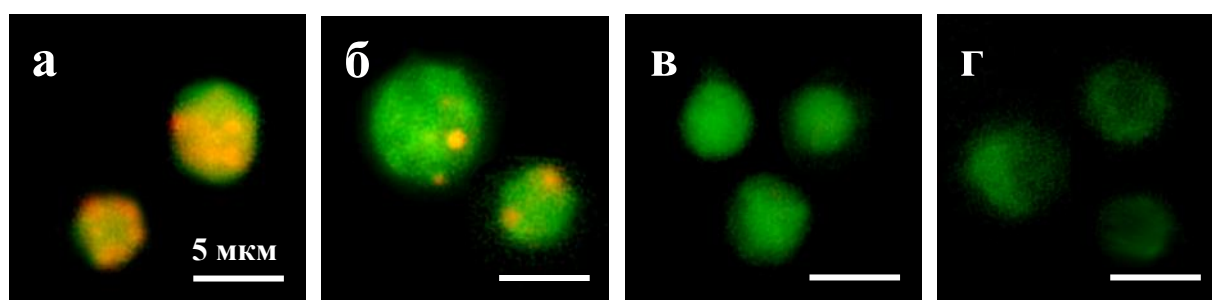


Рисунок 13 – Морфологические типы дисковидных тромбоцитов человека.

Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым.

а – тромбоциты с большим числом гранул; б – тромбоциты с 1-2 гранулами; в – тромбоциты без гранул с нормальной яркостью цитоплазмы; г – тромбоциты без гранул с низкой яркостью цитоплазмы

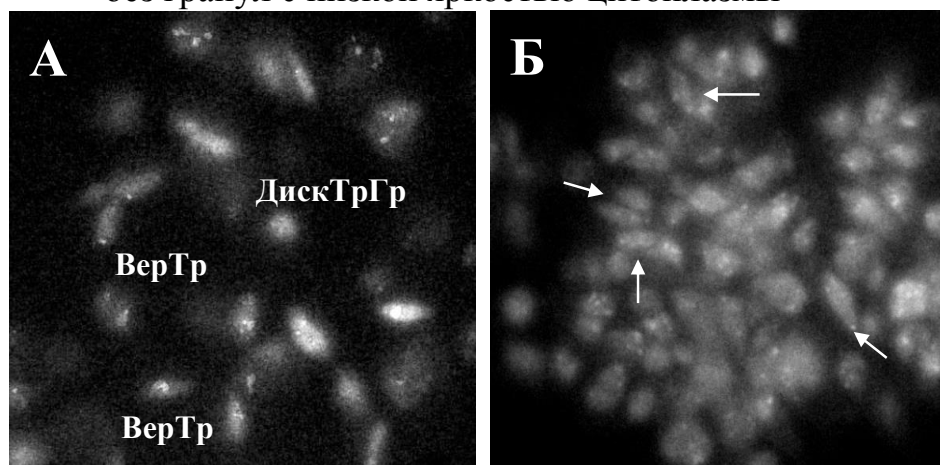


Рисунок 14 – Морфофункциональные особенности веретеновидных тромбоцитов. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – Выявление веретеновидных тромбоцитов через 2 суток хранения БоТП при 22°C. Увеличение  $\times 1000$ . Условные обозначения: ВерТр – веретеновидный тромбоцит; ДискТрГр – дисковидный тромбоцит с гранулами. Б – Участие веретеновидных тромбоцитов в образовании агрегата на стекле. Увеличение  $\times 1000$ . Веретеновидные тромбоциты показаны стрелками.

Неоднократно показано, что активно функционировать могут лишь тромбоциты с гранулами [91, 115, 305]. При активации высокими дозами АДФ тромбоциты с гранулами уже через 5-10 минут образуют тесные конгломераты, на поверхности которых очень хорошо видны клетки, секретирующие гранулы, а также клетки, где гранулы смещены к периферии цитоплазмы. С другой стороны, на периферии таких агрегатов нередко можно выявить дискоциты с 1-2 гранулами и даже без гранул, при том, что полная дегрануляция не наступает в течение 10-15 минут. Морфофункциональный анализ тромбоцитов в плазме до и после агрегации *in vitro* также указывает на способность дискоцитов без гранул участвовать в образовании агрегатов. Так, например, в богатой тромбоцитами плазме до начала агрегации общая концентрация клеток составляла 356 тыс/мкл клеток, из них 60% содержали гранулы. После активации коллагеном и инкубации пробы в течение 30 минут при 37°C общая концентрация тромбоцитов в плазме составила всего 40 тыс/мкл, при этом почти все тромбоциты в суспензии были представлены многоотростчатыми или деформированными клетками, т.е. в плазме остались преимущественно те тромбоциты, которые изначально были функционально непригодными. В то же время, исходное содержание тромбоцитов без гранул составляло 142 тыс/мкл, из них около 100 тыс/мкл – клетки дисковидной формы. Следовательно, дискоциты без гранул также вошли в состав агрегатов. Стоит особо подчеркнуть, что этот эффект наблюдается лишь в пробах с нормальным содержанием тромбоцитов с гранулами, или близким к нормальному (не менее 30%). В пробах с исходно низким качеством тромбоцитов дискоциты без гранул не участвуют в формировании агрегатов. По всей вероятности, многие дискоциты без гранул сохраняют небольшой функциональный потенциал, но он может быть реализован лишь кумулятивно, когда общий морфофункциональный статус тромбоцитов находится на нормальном уровне.

## ГЛАВА 4. СПОСОБЫ СТИМУЛЯЦИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СТАНДАРТНЫХ ИНДУКТОРОВ АГРЕГАЦИИ

### **4.1 Влияние высоких концентраций диметилсульфоксида на биологическую активность тромбоцитов**

Диметилсульфоксид (ДМСО) является одним из наиболее известных апротонных растворителей, который имеет широкий спектр применения в научно-исследовательской и научно-практической деятельности. Высокая проникающая способность ДМСО используется при разработке трансдермальных транспортных средств, противовоспалительных, бактерицидных и обезболивающих мазей, противоопухолевых препаратов [12, 15, 83]. Считается, что лекарственные дозы ДМСО нормализуют микроциркуляцию крови и фибринообразование [162, 164, 197], однако детальных исследований влияния высоких доз ДМСО на тромбоциты не проводилось. Ранее нами было показано, что в присутствии 5-6% ДМСО биологическая полноценность тромбоцитов постепенно снижается [41], это было связано, в первую очередь, с разрушением тромбоцитарных гранул. Справедливо предположить, что при более высоких концентрациях ДМСО этот процесс будет ускорен. С другой стороны, увеличение проницаемости плазматической мембраны часто приводит не только к разрушению тромбоцитов, но также к их спонтанной активации [136, 190, 206]. Кроме того, в условиях повышенной мембранной проницаемости содержимое тромбоцитарных гранул может массово выходить за пределы тромбоцитов и оказывать биологический эффект независимо от тромбоцитов. В связи с этим было необходимо исследовать морфофункциональный статус тромбоцитов в присутствии высоких концентраций ДМСО, а также исследовать формы их биологической активности под действием ДМСО.

В образцах БоТП относительное содержание тромбоцитов с гранулами исходно составляло 57 [52; 63]%, содержание ТБГ – 26 [23;31] %, ААТ – 55 [51; 62] баллов, таким образом, до воздействия ДМСО медианный уровень структурно и функционально полноценных тромбоцитов в БоТП превышал 50%. После введения в пробы БоТП высоких доз ДМСО наблюдалось резкое падение ААТ: если при 5% ДМСО адгезивная активность тромбоцитов БоТП полностью исчезала через 2-3 часа, то при 10% – через 30 мин, а при 20% и выше – всего лишь через 5 мин. Примечательно, что в условиях 5% ДМСО все клетки из популяции ТБГ (тромбоциты богатые гранулами) и часть остальных исходно полноценных тромбоцитов сохраняли гранулы в своем составе в течение 90 мин, а также сохраняли способность к адгезии. При более длительной экспозиции при 5% ДМСО ТБГ также теряли гранулы. Во всех случаях присутствие ДМСО в БоТП приводило к постепенному сокращению числа клеток с гранулами вплоть до полного их исчезновения, однако скорость этого процесса сильно варьировала в зависимости от содержания ДМСО. Так, при концентрации ДМСО от 5% до 20% полная дегрануляция биологически полноценных тромбоцитов наступала через 4-6 часов, при 25% – через 2 часа, а при 30% и 40% ДМСО – всего лишь через 10 мин. Морфология большинства тромбоцитов не претерпевала видимых изменений под действием высоких концентраций ДМСО, но, с другой стороны, практически во всех случаях можно было наблюдать клетки с формой, характерной для прокоагулянтных тромбоцитов [248]. Внесение ДМСО всегда вызывало достоверное повышение температуры БоТП, которая увеличивалась с ростом дозы и достигала предельных значений через 1 мин, при этом в условиях 30-40% ДМСО температура образцов БоТП была близка к физиологическим значениям циркулирующей крови (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние разных концентраций ДМСО на формирование тромбофибриновых сгустков

Конечная концентрация ДМСО в БоТП, %	Температура образцов БоТП* после внесения ДМСО, °С	Время полной дегрануляции тромбоцитов, мин	Размер тромбофибриновых и фибриновых сгустков, мкм
5	26,2	360	Нет сгустков
10	28,0	300	Нет сгустков
20	29,7	250	10-100
25	31,5	120	30-150
30	36,8	10	40-450
40	37,0	10	40-500
*температура исходных БоТП составляла 20°С			

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 (рис. 15). Подавляющая часть (свыше 90%) тромбоцитов в составе сгустков выявлялась в виде отдельных, не связанных друг с другом клеток, хотя в отдельных случаях также можно было наблюдать и небольшие плотные агрегаты тромбоцитов, чаще всего расположенные в глубине сгустка. В агрегатах клетки имели распластанную или отросчатую форму, характерную для разных стадий адгезии, тогда как многочисленные одиночные фибрин-ассоциированные тромбоциты преимущественно сохраняли дисковидную или близкую к ней форму (рис. 16). Уровень фибриногена в обследованных образцах БоТП до внесения ДМСО составил в среднем 2,8 г/л и значимо не менялся после экспозиции БоТП в течение 24 часов с 5-10% ДМСО; в БоТП с 20-25% ДМСО конечный уровень фибриногена составил 0,4 г/л, с 30-40% – менее 0,1 г/л ( $p < 0,05$ ), что также указывает на активацию фибринообразования в условиях 20-40% ДМСО.



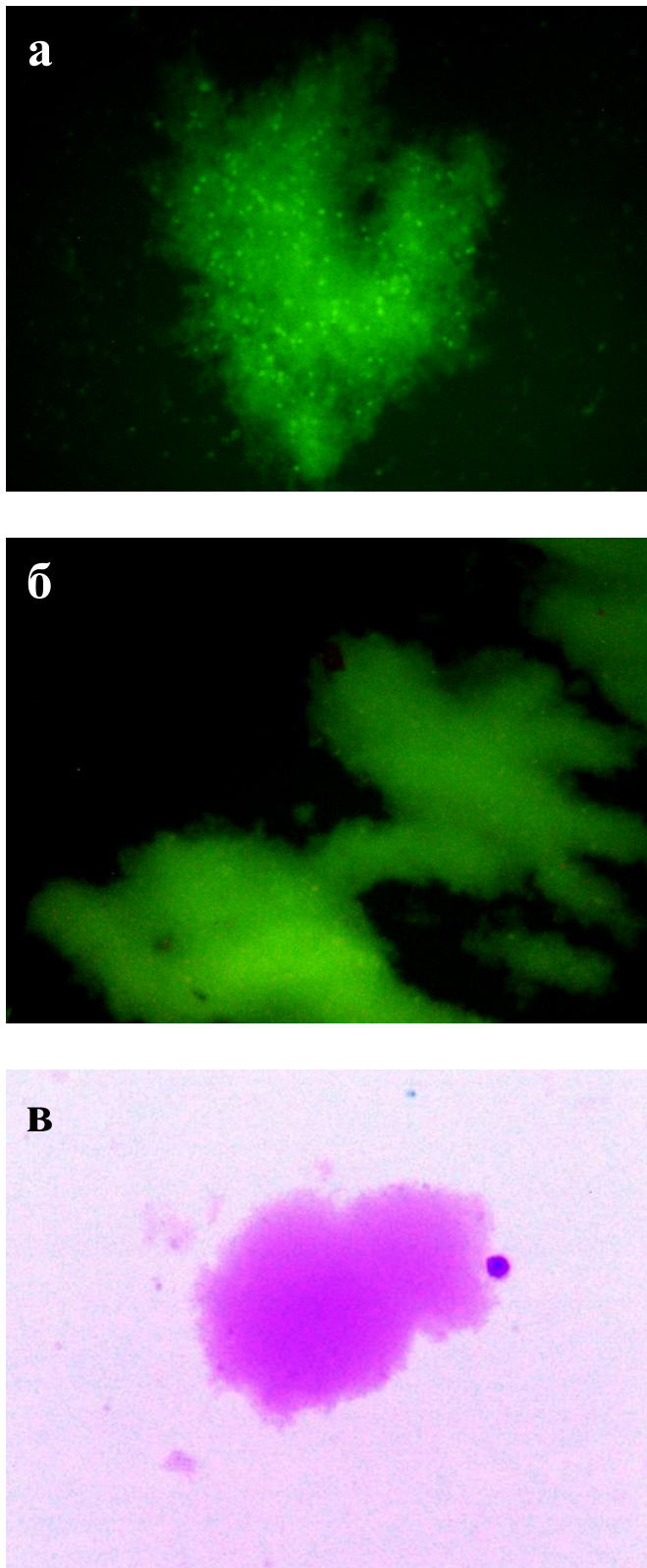


Рисунок 15 – Образование тромбофибриновых сгустков в БоТП под действием 20% ДМСО во флуоресцентном микроскопе (а, б) и при гистологическом окрашивании (в). а – через 5 часов экспозиции (окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым); б, в – через 24 часа экспозиции. а, б - окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым, в – окрашивание на фибрин метиловым фиолетовым по Вейгерту. Увеличение x500.

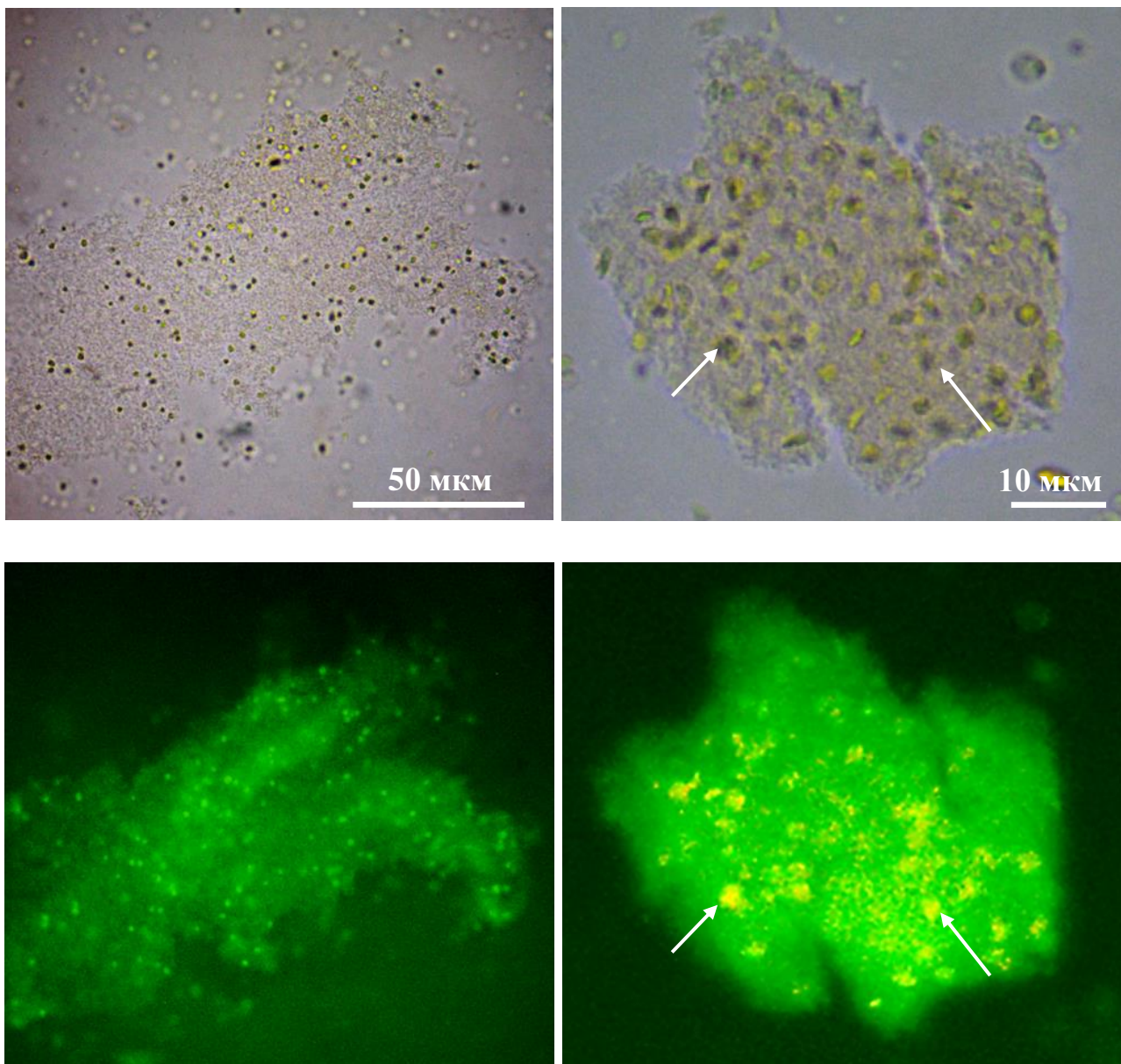


Рисунок 16 – Тромбофибриновый сгусток в БоТП через 5 мин экспозиции с 40% ДМСО в проходящем свете (верхний ряд) и при окрашивании трипафлавином-акридиновым оранжевым (нижний ряд). Стрелками указаны адгезирующие тромбоциты.

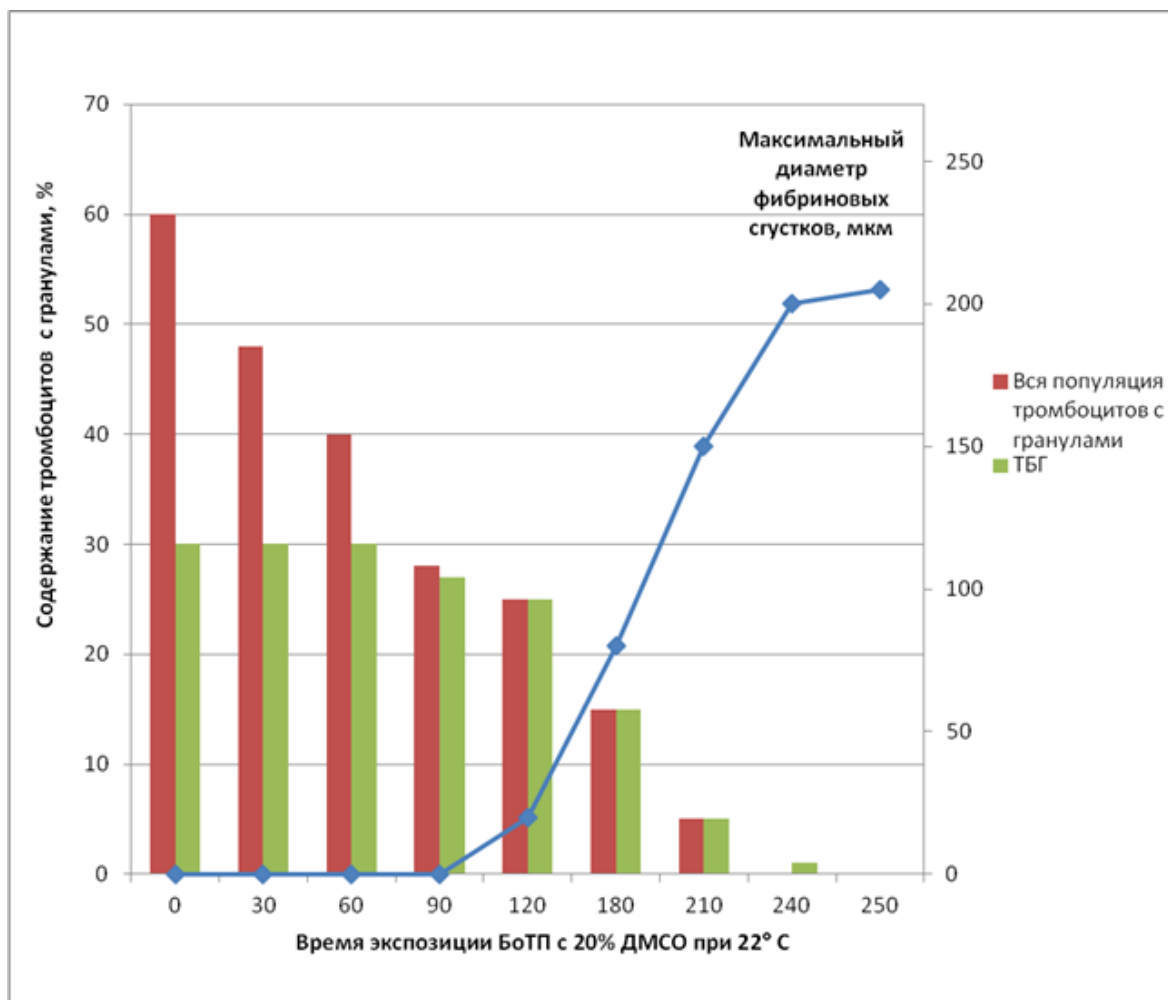


Рисунок 17 – Динамика снижения содержания тромбоцитов с гранулами и роста размеров тромбофибриновых сгустков в БоТП в процессе экспозиции с 20% ДМСО при комнатной температуре.

Размеры выявляемых сгустков сильно варьировали, однако их максимальные значения увеличивались с ростом концентрации ДМСО в пробе (табл. 4). Кроме того, при 20-25% ДМСО можно было отчетливо проследить динамику постепенной дегрануляции тромбоцитов с гранулами и параллельно идущий рост размеров сгустков (рис. 17). В ходе работы установлена выраженная корреляционная связь между степенью дегрануляции ТБГ и диаметром сгустков ( $r=0,92$ ,  $p=0,000$ ); образующиеся фибриновые и тромбофибриновые конгломераты достигали своего максимального размера вскоре после дегрануляции всех ТБГ и затем уже значительно не увеличивались. Фибриновые сгустки сохранялись в течение всего времени наблюдения, при

этом если в течение 4-8 часов тромбоциты в составе таких сгустков выявлялись как внутри, так и на поверхности (рис. 15а), то через 24 часа поверхность всех фибриновых сгустков была практически свободна от тромбоцитов (рис. 15б). Это может быть связано с отделением пассивно прикрепленных одиночных тромбоцитов.

При 25-40% ДМСО максимальный размер фибриновых и тромбофибриновых сгустков носил выраженный дозозависимый характер в зависимости от содержания тромбоцитов с гранулами в БоТП. Так, при полном отсутствии клеток с гранулами в БоТП (образцы БоТП через 5 суток хранения при 20-22°C) после внесения 20-30% ДМСО сгустки не образовывались, при Стр.гр.=20 тыс/мкл максимальный размер образующихся сгустков составил 10 мкм, при 50 тыс/мкл – 20 мкм, при 100 тыс/мкл – 70 мкм, при 200 тыс/мкл – 120 мкм, при 400 тыс/мкл – 300 мкм, при 500 тыс/мкл – 500 мкм ( $r=0,940$ ,  $p=0,000$ ). Стоит отметить, что при 40% ДМСО в бесклеточной плазме можно было выявить отдельные мелкие фибриновые сгустки до 10 мкм, однако их число было очень невелико. Можно заключить, что концентрации тромбоцитов с гранулами в БоТП играет решающую роль при образовании фибриновых и тромбофибриновых сгустков под действием ДМСО.

В опытах с 20 и 25% ДМСО скорость формирования фибриновых и тромбофибриновых сгустков заметно увеличивалась при помещении образцов БоТП в термостат. Если при 22°C время дегрануляции всех тромбоцитов БоТП в присутствии 20% ДМСО составило 250 мин, то при 37°C – всего 35 мин. Примечательно, что в образцах БоТП, подвергшихся предварительной криодеструкции (при -20 / -40°C), образование выраженных фибриновых сгустков отмечено только при 40% ДМСО. В пробах с 20-25% ДМСО формирование сгустков полностью отсутствовало, при 30% ДМСО наблюдалось формирование многочисленных мелкодисперсных фибриновых сгустков (до 25 мкм), суммарно занимавших значительный объем БоТП, придавая ей кашеобразную («gruel-like») консистенцию. В пробах с 40% ДМСО отмечено

формирование образовывались фибриновые сгустки диаметром до 200 мкм, при этом тромбоциты в составе сгустков полностью отсутствовали.

Проведенное исследование показало, что в присутствии высоких доз ДМСО в БоТП происходит массовая дегрануляция тромбоцитов, не обусловленная активной адгезией этих клеток или действием индуктора активации. В данном случае дегрануляция обусловлена нарушением структурной целостности тромбоцитов, которое приводит к активному фибринообразованию в БоТП при 25-40% ДМСО. Наиболее интенсивно этот процесс наблюдался в опытах с 30-40% ДМСО, когда помимо быстрой и тотальной дегрануляции тромбоцитов в первые минуты отмечался рост температуры БоТП до 37°C, что также могло способствовать образованию тромбофибриновых сгустков. Можно предположить, что дегранулирующий под действием высоких доз ДМСО тромбоцит создает своего рода центр активации свертывания, при том, что сама клетка не является активированной. В таких условиях стремительный выброс гранул и их компонентов в течение первых нескольких минут способен также активировать тромбоциты (в первую очередь, из субпопуляции ТБГ), чья функциональная активность еще полностью не утрачена под действием ДМСО. В результате в образующемся тромбофибриновом сгустке можно выявить тромбоцитарные агрегаты наряду с отдельными клетками. Необходимо отметить, что после предварительной криодеструкции тромбоцитов БоТП размер фибриновых сгустков, образующихся под действием ДМСО, заметно меньше того, что наблюдается при внесении ДМСО в исходные БоТП. Следовательно, для активного роста фибриновых сгустков в БоТП с большими дозами ДМСО необходим быстрый выброс гранул тромбоцитов, возможный лишь при условии их исходной структурной целостности. Это подтверждается тем, что в бесклеточной плазме в условиях высокого содержания ДМСО фибриновые сгустки не образовывались; наличие в плазме мелких сгустков при 40% ДМСО может быть обусловлено тесной ассоциацией молекул ДМСО с гидрофобными участками фибриногена

[162,164]. Средство ДМСО с фибриногеном, по всей вероятности, также способствует образованию фибриновых сгустков, но не является решающим, поскольку максимальный размер сгустков напрямую зависел от содержания тромбоцитов с гранулами (Стр.гр.) в исходной БотП. Тот факт, что динамика роста размеров фибриновых сгустков коррелировала с динамикой снижения содержания ТБГ, указывает на то, что такие тромбоциты (наиболее богатые гранулами и другими мембранными компонентами) содержат значительную часть биологически активных веществ, присущих тромбоцитам. С другой стороны, также выявлена корреляция между размером сгустков и общим содержанием тромбоцитов с гранулами (в тыс/мкл). Все это говорит не только о том, что биологически полноценные тромбоциты (клетки с гранулами) обладают высоким биологическим потенциалом, но и о том, что этот потенциал может быть реализован даже в условиях полной инактивации тромбоцитов. Поэтому искусственное снижение функциональной активности тромбоцитов (например, под действием препаратов-антиагрегантов) не лишает полностью эти клетки их биологической активности, что также необходимо учитывать в научно-исследовательской и практической деятельности.

#### **4.2 Влияние тоничности раствора на активность тромбоцитов**

In vivo тоничность плазмы может меняться при выраженных нарушениях водно-солевого баланса, обусловленных кровопотерей, обширными ожогами тела, нарушением работы почек и т.д., которые часто могут сопровождаться различными тромбоцитопатиями. Проведенное исследование показало, что при концентрации хлорида натрия (NaCl) от 0,075М до 0,11М тромбоциты человека претерпевают выраженные морфологические изменения и формируют многочисленные агрегаты, которые не разрушаются при ресуспендировании и возвращении в изотонические условия. В условиях 0,075-0,11М NaCl все тромбоциты с гранулами имели округлую форму (рис. 18а), характерную тромбоцитов ранней стадии активации. Гранулы в составе тромбоцитов были заметно увеличены в диаметре и связаны с плазматической мембраной лишь в

течение первых 5-10 мин воздействия. После этого часть гранул выходила за пределы тромбоцитов, что сопровождалось их активацией как при 37°C так и при 22°C. Формирование агрегатов было наиболее выражено при 0,11М NaCl – в этом случае порядка 90-95% клеток с гранулами выявлялись в составе агрегатов диаметром до 100 мкм (рис. 18б). При 0,1М NaCl максимальный размер агрегатов составлял 70 мкм, при 0,075М NaCl – 40 мкм. На периферии агрегатов и в плазме можно было отчетливо видеть клетки с морфологией, характерной для прокоагулянтных тромбоцитов (рис. 18). В условиях гипотонии тромбоциты с гранулами активно адгезировали на стекле, что позволяло отчетливо визуализировать их характерную распластанную форму с выраженным ламеллярным краем по всей окружности клетки. Перевод клеток из гипотонической среды (0,1-0,11М NaCl) обратно в изотоническую среду не сопровождался возвращением их дисковидной формы и исходного распределения гранул, что указывает на необратимость активации тромбоцитов в условиях гипотонии. Можно предположить, что набухание гранул тромбоцитов в условиях 0,075-0,11М NaCl воспринимается системами внутриклеточного сигналинга как начало активной секреции гранул, что стимулирует характерную перестройку цитоскелета и дальнейшую активацию тромбоцитов. В гипертонической среде (с концентрацией NaCl свыше 0,15М) активации тромбоцитов не происходило – напротив, в условиях гипертонии тромбоциты полностью теряли способность к функционированию. Если в норме адгезивная активность тромбоцитов БoTII значительно не менялась в течение 1 суток при 22°C, то при 0,25М NaCl адгезивная активность полностью исчезала через 2,5 часа, при 0,35М NaCl – через 1,5 часа, при 0,6М NaCl – через 15 мин, при 1М NaCl – через 1-2 мин.

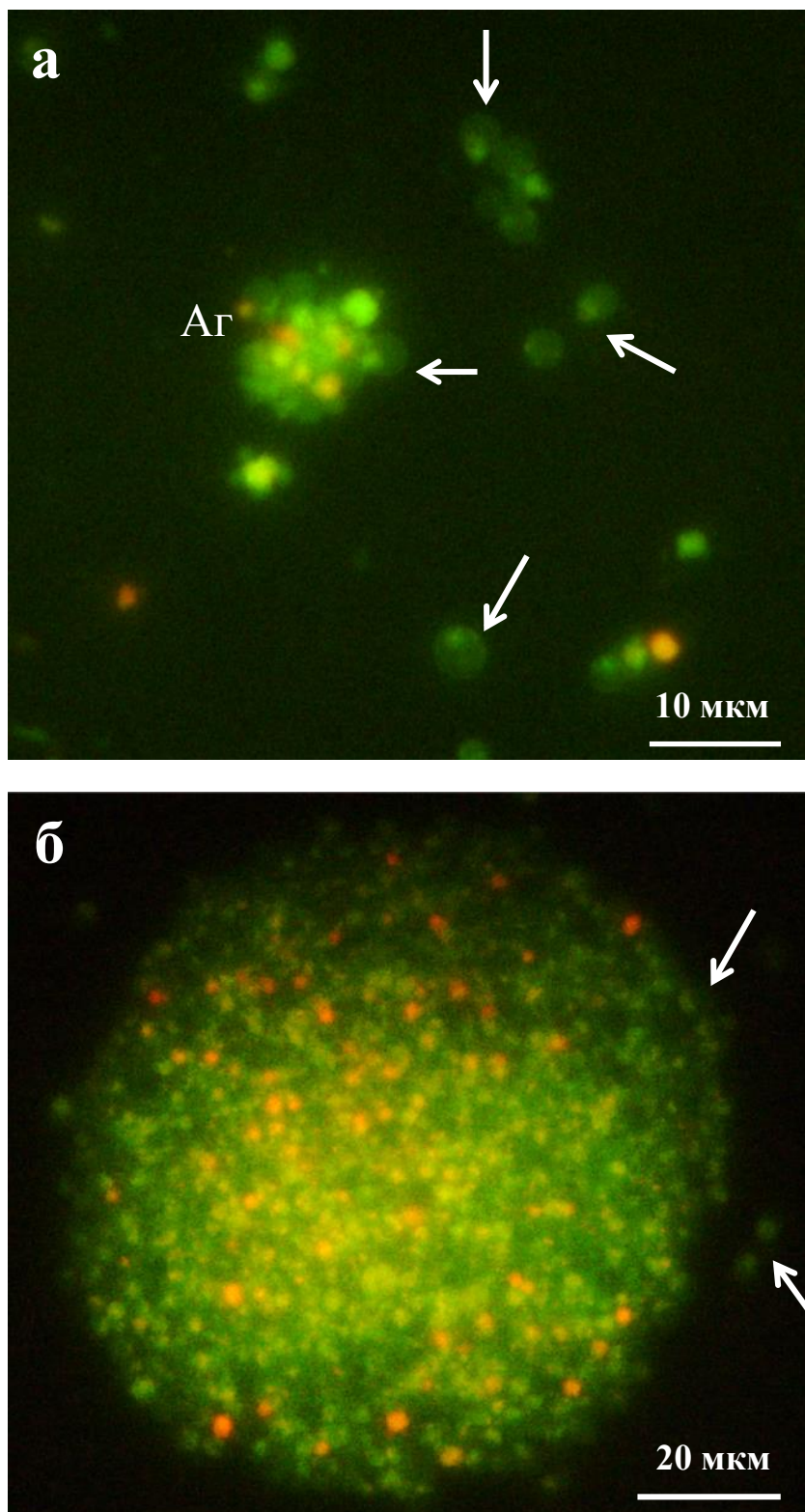


Рисунок 18 – Тромбоциты человека в условиях гипотонии (0,11M NaCl) при 22°C. Окраска витальным красителем на основе триафлавина и акридинового оранжевого. а – адгезия тромбоцитов на стекле с образованием агрегатов (Аг); б – крупный тромбоцитарный агрегат, сформированный в условиях 0,11M NaCl. Стрелкой показаны клетки с морфологией, характерной для прокоагулянтных тромбоцитов.



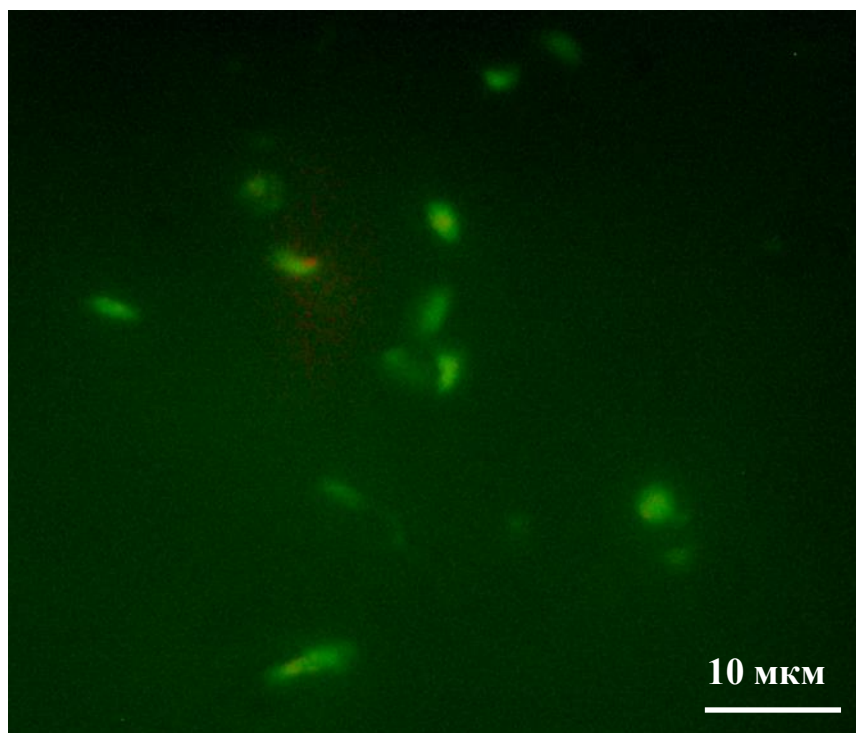


Рисунок 19 – Тромбоциты человека в условиях гипертонии (0,6М NaCl) при 22°C. Окраска трипафлавином и акридиновым оранжевым.

Под действием гипертонии тромбоциты сморщивались, принимали полигональную, веретеновидную или отросчатую форму, гранулы в их составе выявлялись очень слабо (рис. 19), что может быть связано с их разрушением или выходом их содержимого в гипертоническую среду. Однако, наличие отростков и возможная дегрануляция в данном случае были свидетельством не активации клеток, а их спонтанной деформации. Примечательно, что похожие морфологические изменения в тромбоцитах могут возникнуть при обработке 96%-ным спиртом или лиофильном высушивании [177], когда, как и в случае гипертонии, наблюдается резкое обезвоживание клеток. В клеточной биологии гипертонические растворы используются для удаления из клеток различных растворимых белковых фракций, в том числе из секреторных везикул, однако этот процесс является явно нефизиологичным. Поэтому возможный выход индукторов агрегации из гранул тромбоцитов под действием не сопровождался активацией самих клеток.

### 4.3 Влияние редокс-потенциала среды на активность тромбоцитов

В биологии и медицине показатель редокс-потенциала (РП) используют в качестве интегральной характеристики окислительно-восстановительных процессов в биологических объектах. Определение РП позволяет оценить баланс про- и антиоксидантных систем биологических сред и отдельных клеток, определить структурную целостность выделенных клеточных компартментов [174]. Для оценки РП чаще всего используют электрохимический метод, основанный на измерении разности потенциалов между инертным измерительным электродом, непосредственно контактирующим с биологической средой, и электродом сравнения при разомкнутой цепи [3, 17].

В сыворотке крови практически здоровых людей значение РП платинового электрода относительно хлор-серебряного электрода сравнения чаще всего варьирует от -60 до -20 мВ, составляя в среднем -38 мВ. Напротив, у пациентов, испытывающих острый оксидативный стресс, величина РП заметно смещается в сторону положительных значений. Проведенное нами исследование показало, что в диапазоне РП от -60 до +10 мВ тромбоциты не претерпевали видимых изменений морфофункционального статуса. При РП=+30 мВ доля биологически полноценных тромбоцитов (клетки с гранулами, способные к адгезии) снижалась в среднем на 30%, при РП=+60 мВ – на 50%, а при РП $\geq$ +100 мВ вся популяция тромбоцитов была неактивной, тромбоциты имели выраженные дефекты мембранных структур и не содержали гранул. При отрицательных РП в диапазоне от -60 до -80 мВ в тромбоцитах наблюдалось смещение гранул к периферии, повышенная скорость адгезии при контакте со стеклом, однако спонтанной активации в плазме не происходила. При значениях РП $\leq$  -100 мВ в БотП наблюдалась спонтанная массовая активация тромбоцитов, которая сопровождалась дегрануляцией и формированием выраженных тромбоцитарных агрегатов. Этот процесс происходил в течение 10-30 минут после внесения восстановителя. Известно, что интегринавые белки тромбоцитов (рецепторы к коллагену и фибрину) имеют в своем составе большое количество тиоловых

(-S-S-) и дисульфидных (-SH) групп, баланс которых определяет функциональное состояние рецептора [225]. При адгезии или агрегации тромбоцитов возрастает активность фермента дисульфидизомеразы, восстанавливающей -S-S- связи в составе интегриновых белков, что ведет к их перестройке, способствуя связыванию тромбоцитов с субстратом [32]. Похожий эффект можно также получить в условиях избытка -SH групп, в частности, с использованием антиоксиданта глутатиона [78]. Таким образом, при значениях РП плазмы  $-100\text{мВ}$  и ниже заметно повышаются восстановительные свойства среды, что является стимулятором активации поверхностных рецепторов тромбоцитов, а затем и самих тромбоцитов. Это необходимо учитывать при электрохимическом исследовании образцов БоТП, а также при исследовании взаимодействия тромбоцитов с различными средами и субстратами.

#### **5.4 Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека, подверженных *in situ* низкоимпульсному лазерному облучению**

Низкоимпульсное лазерное излучение (НИЛИ) в видимой части спектра способно стимулировать многие процессы в клетках человека [27, 79, 110, 199]. При витальном флуорохромном окрашивании тромбоциты также испытывают непосредственное воздействие НИЛИ, иногда в течение 1-2 часов. В связи с этим было очень важно провести морфофункциональный анализ тромбоцитов, подверженных воздействию разных волн НИЛИ в видимой части спектра. В данной работе была возможность осуществить такое воздействие *in situ*, когда витально окрашенные тромбоциты находились в небольшом объеме на предметном стекле. Источником НИЛИ выступали лазерные установки, присутствующие в комплекте конфокального микроскопа «Nikon D-Eclipse C1». Возможности облучить тромбоциты *in vitro* в пробирке или в кювете, к сожалению, не было. С другой стороны, используемые в микроскопии стекла обладают очень высокими фотооптическими свойствами [52], поэтому исследование тромбоцитов *in situ* представляется вполне оправданным.

Воздействие синего ( $\lambda=488$  нм) и зеленого ( $\lambda=543$  нм) света не вызывало никаких изменений в морфофункциональном статусе тромбоцитов (рис. 20а,б), их структурные и функциональные характеристики оставались такими же, что и до облучения. Стоит особо подчеркнуть, что свет с длиной волны 450-490 нм используется в нашей методике для инициации флуоресценции витально окрашенных тромбоцитов [41], при этом даже при длительном облучении (2-4 часа) тромбоциты полностью сохраняют свой морфофункциональный статус. Напротив, 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 часть тромбоцитов уже дегранулировалась, содержание интактных тромбоцитов с гранулами снижалось в среднем в 1,3 раза. Одновременно с этим наблюдалось изменение формы тромбоцитов – через 1-5 мин облучения тромбоциты с гранулами начинали увеличивать свой диаметр, становясь более уплощенными, у некоторых клеток в суспензии можно было видеть выпячивания плазматической мембраны (ламеллоподии), характерные для адгезирующих тромбоцитов (рис. 20в). Через 15-20 мин многие тромбоциты формировали мелкие агрегаты диаметром до 10-12 мкм, значительная часть клеток в их составе уже не содержала гранул, также активная дегрануляция наблюдалась среди одиночных тромбоцитов. Общий уровень тромбоцитов с гранулами после облучения красным светом при плотности мощности 20 мВт/см<sup>2</sup> достоверно снижался в течение всего времени наблюдения: через 5 минут после облучения содержание тромбоцитов с гранулами составило в среднем 78% от исходного значения, через 10-15 мин – 15%, через 30 мин – 2% (табл. 4).

Таблица 4 – Содержание тромбоцитов с гранулами в плазме после облучения модулированным красным и ультрафиолетовым светом *in situ*

Тип образца	Число исследований	Продолжительность облучения	Содержание тромбоцитов с гранулами, % Me [25%; 75%]
Тромбоциты до облучения (контроль)	n = 18	-	50 [48; 53]
Облучение красным светом, плотность мощности 20 мВт/см <sup>2</sup>	n = 13	0,5-1 мин	50 [47; 53]
	n = 15	5 мин	38 [36; 41]*
	n = 15	10-15 мин	8 [5; 9]* <sup>+</sup>
	n = 12	30 мин	1 [0; 1]* <sup>+#</sup>
	n = 10	60 мин	0 [0; 0]* <sup>+#</sup>
Облучение УФ-светом, плотность мощности 40 мВт/см <sup>2</sup>	n = 10	5 мин	50 [48; 51]
	n = 12	10-15 мин	25 [25; 26]* <sup>+</sup>
	n = 12	30 мин	7 [4; 8]* <sup>+#</sup>
	n = 10	60 мин	3 [1; 5]* <sup>+#</sup>
*p<0,05 относительно контроля + p<0,05 относительно воздействия тем же светом в течение 5 мин # p<0,05 относительно воздействия тем же светом в течение 10-15 мин (критерий Вилкоксона)			

Таким образом, 30 мин облучения красным светом вызывало практически тотальную дегрануляцию тромбоцитов *in situ*. Аналогичный эффект был отмечен в опытах, где плотность мощности красного света составляла соответственно 10 и 5 мВт/см<sup>2</sup>. При этом общая морфология тромбоцитов не претерпевала никаких видимых нарушений, общий рисунок окрашенной цитоплазмы, а также ее яркость, были такими же, как при адгезии тромбоцитов на стекле или при воздействии стандартных индукторов агрегации. Воздействие ультрафиолетового света ( $\lambda=408$  нм) оказывало эффект, аналогичный действию красного света (уменьшение числа клеток с гранулами), однако скорость дегрануляции тромбоцитов была несколько меньше. Через 5 минут облучения

уровень тромбоцитов с гранулами в суспензии значительно не менялся, через 15 минут дегранулировали 50% тромбоцитов, через 30 мин – 85%, через 60 мин – 93% (табл. 4).

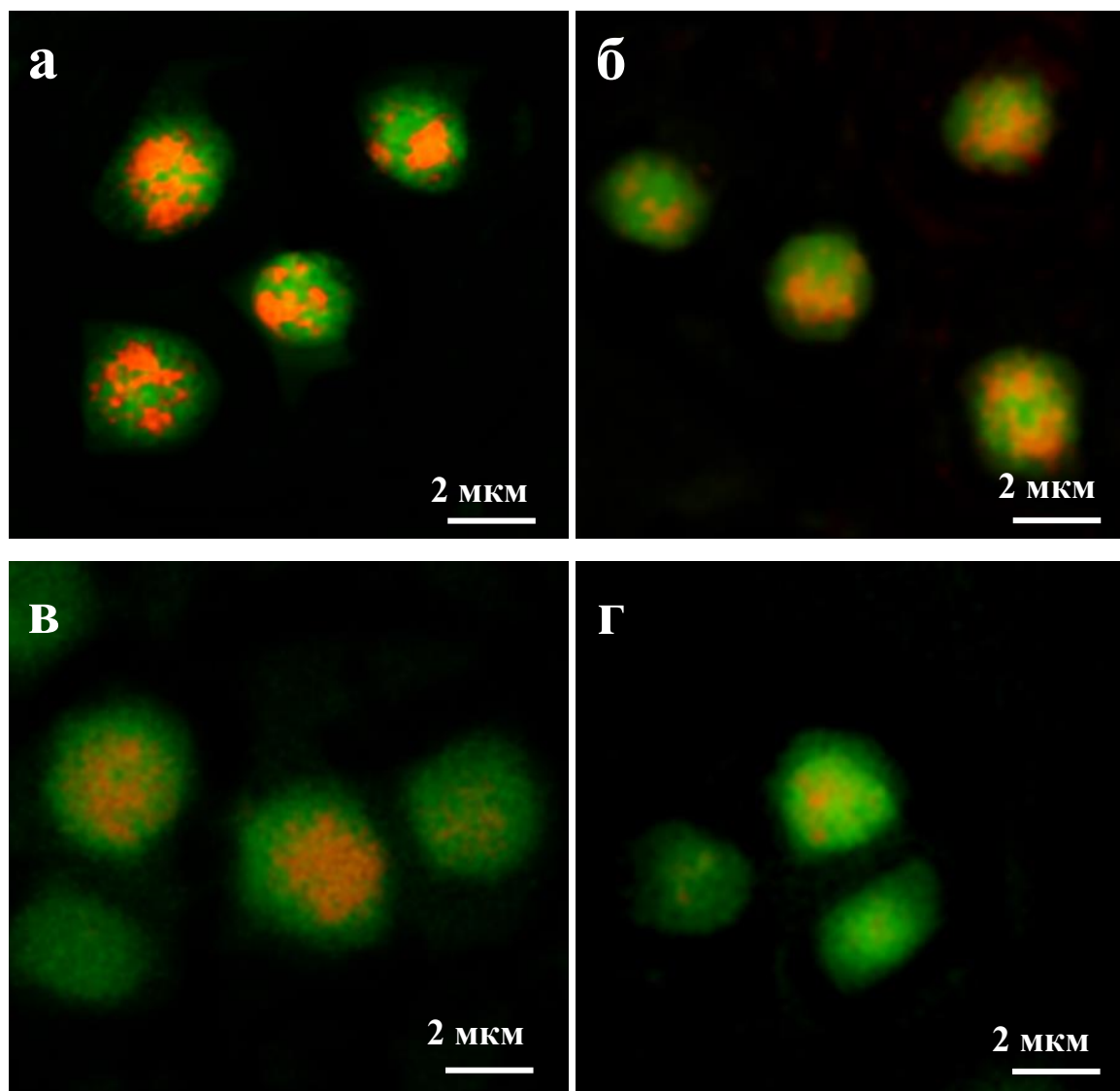


Рисунок 20 – Морфология тромбоцитов человека после воздействия модулированного НИЛИ *in situ*. Витальное окрашивание трипафлавином и акридиновым оранжевым.

а – исходные необлученные тромбоциты (контроль); б – облучение тромбоцитов голубым светом ( $\lambda=488$  нм) в течение 60 мин; в – облучение тромбоцитов красным светом ( $\lambda=637$  нм) в течение 15 мин; г – облучение тромбоцитов УФ-светом ( $\lambda=408$  нм) в течение 15 мин

Смещение гранул к периферии цитоплазмы начиналось через 10 мин облучения, образование тромбоцитарных агрегатов – через 15-20 мин. При этом в образующихся агрегатах гранулы сохраняли связь с тромбоцитами дольше, чем в отдельных клетках: даже через 30-40 мин после облучения при витальном окрашивании можно было выявить гранулы на поверхности тромбоцитарных агрегатов, тогда как отдельно расположенные клетки в значительной степени дегранулировали (рис. 20, 21). Полный выход гранул из тромбоцитов, образующих агрегаты, наблюдался только через 60 мин.

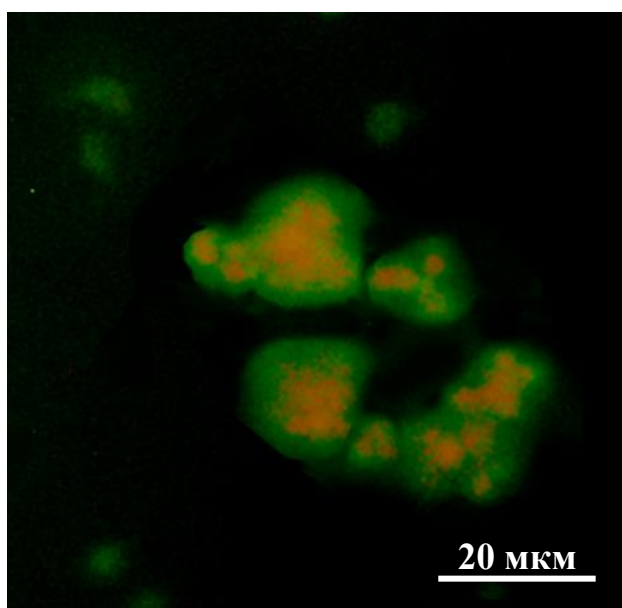


Рисунок 21 – Образование тромбоцитарных агрегатов после облучения тромбоцитов УФ-светом ( $\lambda=408$  нм) в течение 30 мин. Витальное окрашивание трипафлавином и акридиновым оранжевым.

Считается, что тромбоциты человека не содержат сильных хромофоров, способных активно поглощать свет видимой части спектра [52]. Вместе с тем, установлено, что модулированный красный свет (630-638 нм) вызывает активацию супероксиддисмутазы и выработку эндогенной перекиси водорода, которая может запускать системы внутриклеточного сигналинга и вызывать активацию тромбоцитов даже в отсутствие индукторов агрегации или субстрата для адгезии [27, 60]. Кроме того, НИЛИ в красном диапазоне стимулирует выход ионов кальция из внутриклеточных депо [109], что также является сильным

стимулом для активации тромбоцитов. В настоящее время в лазерной медицине идет дискуссия относительно способности НИЛИ стимулировать термодинамические процессы в клетках [47, 79, 109]. Есть мнение, что при воздействии на клетки НИЛИ вызывает локальное перераспределение тепла, создает «температурный градиент», который влияет на активность белков, в том числе – на кальциевые каналы, и не связан с фотобиологическим эффектом [47]. При этом сами авторы гипотезы «температурного градиента» признают отсутствие прямых доказательств его существования. В любом случае, активация тромбоцитов под действием НИЛИ длиной 630-638 нм является бесспорной. Начальные стадии активации, связанные с перемещением гранул к периферии тромбоцита, начинаются уже через 0,5-1 мин облучения красным светом, а через 5 мин уже более 20% тромбоцитов с гранулами оказываются высокоактивированными и дегранулируют. С учетом того, что высокоактивированные тромбоциты уже не могут проявлять адгезивной или агрегационной активности, общий функциональный потенциал тромбоцитов должен снижаться. Это может объяснять эффект, отмеченный в работе Н.Н. Петрищева и др. [56], когда после 3 мин облучения красным светом (630 нм) агрегационная активность тромбоцитов снижалась почти на 40%. И напротив, НИЛИ длительностью 0,5 мин достоверно увеличивало агрегационную активность. Очень вероятно, что это связано именно со смещением гранул и внутренней перестройкой функционально полноценных тромбоцитов, которая в условиях всей популяции создает условия для более интенсивной агрегации. Таким образом, НИЛИ красным светом длительностью до 1 мин создает своего рода предстимуляцию тромбоцитов. Этот эффект может быть использован для повышения адгезивной активности тромбоцитов. Применение в клинической практике технологий фотомодификации крови с помощью НИЛИ требует параллельного анализа морфофункциональных свойств тромбоцитов.



## ГЛАВА 5. СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ СЕКРЕТОРНЫХ ВЕЗИКУЛ В СОСТАВЕ АДГЕЗИРУЮЩИХ ТРОМБОЦИТОВ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА

### **5.1 Стабилизация тромбоцитов человека на адгезивном субстрате с помощью тикагрелора.**

#### **5.1.1. Влияние тикагрелора на адгезирующие тромбоциты**

Тикагрелор является антиагрегантом прямого действия, который не требует метаболической переработки и способен сразу взаимодействовать с тромбоцитами. Ранее нами показано, что предварительная инкубация БоТП с тикагрелором значительно снижало их адгезивную активность, но при этом не исследовали воздействие тикагрелора на тромбоциты, находящиеся на начальной стадии адгезии. Считается, что действие препаратов-антиагрегантов основано на подавлении АДФ-зависимых рецепторов плазматической мембраны, что приводит к невозможности активации тромбоцита от внешних сигналов [32]. Помимо этого, тикагрелор блокирует некоторые пути внутриклеточного сигналинга, которые запускают дегрануляцию тромбоцитов [97]. Было сделано предположение, что воздействие тикагрелора на уже адгезировавшие тромбоциты вызовет подавление дальнейших этапов адгезии тромбоцитов и их активации, т.е. позволит стабилизировать функционально пригодные тромбоциты на поверхности субстратов

В исходных образцах БоТП морфофункциональная активность тромбоцитов составила в среднем  $53,8 \pm 2,2$  балла, адгезивная активность –  $52,0 \pm 2,0$  балла, т.е. тромбоциты используемых БоТП изначально имели нормальную биологическую полноценность. Экспозиция БоТП с субстратами адгезии в течение 10 мин при  $37^\circ\text{C}$  (до внесения тикагрелора) сопровождалась активной адгезией тромбоцитов на поверхности этих субстратов, что было отчетливо видно во флуоресцентном микроскопе на витально окрашенных препаратах (рис. 22). Уже через 10 мин экспозиции содержание адгезировавших клеток на поверхности покровных стекол составило  $90,6$  тыс/см<sup>2</sup>, на поверхности

стеклянных бусин – 88,8 тыс/см<sup>2</sup>, на поверхности коллагеновых повязок – 105,6 тыс/см<sup>2</sup>, после чего общее содержание клеток на субстрате (независимо от наличия в них гранул) менялась незначительно. При этом часто адгезирующие клетки образовывали тесные скопления на поверхности субстратов (рис. 22). В образцах БоТП, которые подвергались экспозиции без тикагрелора (контроль), наблюдалось достоверное снижение содержания тромбоцитов с гранулами в суспензии – так, в пробах с покровными стеклами и стеклянными бусинами содержание тромбоцитов с гранулами через 10 мин экспозиции снизилось в среднем на 10%, через 1 час экспозиции – на 50%, через 24 часа – на 100%; в пробах с коллагеновыми повязками – соответственно на 15%, 90% и 100%. Таким образом, через 1 сутки экспозиции с адгезивными субстратами БоТП уже не содержали функционально пригодных клеток в суспензии вследствие их массовой активации. Однако при этом подавляющая часть тромбоцитов (свыше 80% от их общего количества) находилась в суспензии в виде отдельных клеток, чаще всего полигональной или отросчатой формы.

Для стабилизации тромбоцитов была выбрана доза 15 мг/л тикагрелора, которая, по нашим предыдущим исследованиям, показала свою эффективность в подавлении адгезивной активности тромбоцитов [41]. Применение тикагрелора позволило сохранить значительную часть функционально пригодных тромбоцитов в неактивированном состоянии: если до внесения тикагрелора снижение Стр.гр. в опытных пробах было сходным с контролем (8-10% для покровных стекол и стеклянных бусин, 12-17% для коллагена), то после внесения динамика снижения Стр.гр. стала гораздо менее выраженной. Через 1 час экспозиции в пробах с предметными стеклами и стеклянными бусинами сохранилось в среднем 92% от всех тромбоцитов с гранулами, через 24 часа – 89%; в пробах с коллагеновой повязкой эти значения соответственно составили 79 % и 77% (табл. 5). Исследование тромбоцитов, адгезировавших на поверхности субстратов показало, что в отсутствие тикагрелора наблюдается массовая дегрануляция прикрепившихся клеток независимо от типа субстрата (рис. 23а-в).

Таблица 5 – Динамика изменения количества клеток с гранулами на поверхности адгезивных субстратов

Тип субстрата	Содержание тромбоцитов с гранулами на субстрате, тыс/см <sup>2</sup> ( $m \pm \sigma$ )					
	Контроль (без тикагрелора)			Опыт (15 мг/л тикагрелора после адгезии)		
	Экпозиция 10 мин	Экпозиция 1 час	Экпозиция 24 часа	Экпозиция 10 мин	Экпозиция 1 час	Экпозиция 24 часа
Покровное стекло (n=25)	90,6 ±7,8	1,1 ±0,2	0	90,6 ±8,4	80,1 ±8,2*	79,6 ±6,6 <sup>#</sup>
Стеклянные бусины (n=25)	88,8 ±9,0	0,4 ±0,1	0	88,7 ±8,0	80,0 ±5,6*	77,7 ±4,5 <sup>#</sup>
Коллаген (n=25)	105,6 ±9,8	0	0	103,4 ±9,2	77,6 ±10,1*	75,7 ±10,5 <sup>#</sup>

\* – относительно контроля через 1 час экспозиции при  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента)  
# – относительно контроля через 24 часа экспозиции при  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента)  
n – число исследований

Таблица 6 – Динамика изменения морфофункциональной активности тромбоцитов на поверхности адгезивных субстратов

Тип субстрата	Морфофункциональная активность тромбоцитов, адгезировавших на субстрате, баллы ( $m \pm \sigma$ )					
	Контроль (без тикагрелора)			Опыт (15 мг/л тикагрелора после адгезии)		
	Экпозиция 10 мин	Экпозиция 1 час	Экпозиция 24 часа	Экпозиция 10 мин	Экпозиция 1 час	Экпозиция 24 часа
Покровное стекло (n=25)	53,1±3,5	24,0±1,1	23,0±1,0	53,2±3,6	49,6±4,8*	46,0±4,2 <sup>#</sup>
Стеклянные бусины (n=25)	53,0±4,0	23,7±1,1	22,9±0,9	53,5±4,0	48,7±5,0*	45,7±2,3 <sup>#</sup>
Коллаген (n=25)	51,4±4,4	22,7±0,9	22,5±0,7	51,2±3,2	48,8±5,2*	39,0±2,2 <sup>#</sup>

\* – относительно контроля через 1 час экспозиции при  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента)  
# – относительно контроля через 24 часа экспозиции при  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента)  
n – число исследований

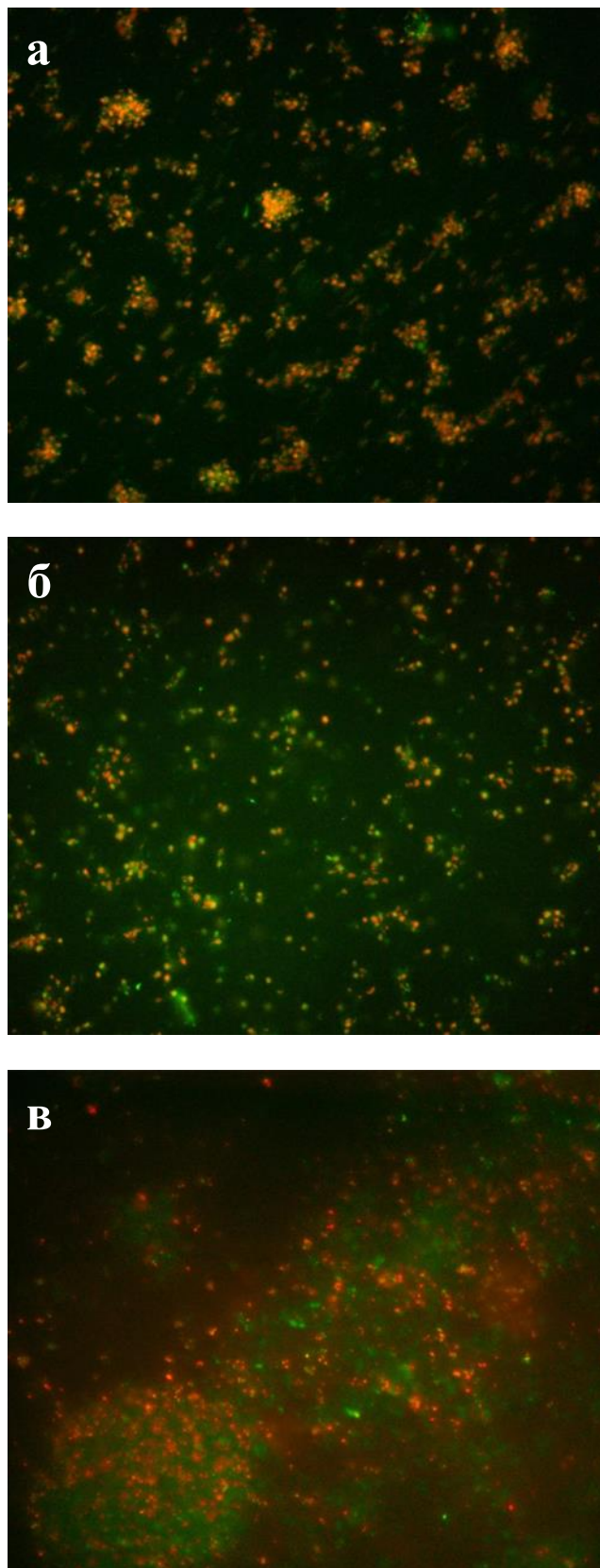


Рисунок 22 – Адгезирующие тромбоциты с гранулами на поверхности адгезивных субстратов (а – покровное стекло, б – стеклянные бусины, в – коллагеновая повязка) через 10 минут инкубации БоТП при 37°C. Витальное окрашивание трипафлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение x200.

Через 24 часа экспозиции гранулы полностью отсутствовали во всех адгезировавших тромбоцитах. Напротив, в образцах, содержащих тикагрелор, процесс дегрануляции был гораздо менее выраженным – так, через 1 час экспозиции среди тромбоцитов, адгезировавших на стекле, гранулы сохранялись в 88-90% клеток, адгезировавших на коллагене – в 75% клеток; через 24 часа – соответственно в 87% и 74% (табл. 5, рис. 23а'-в'). Динамика изменения морфофункциональной активности тромбоцитов (отражающей их структурную целостность) была сходной с динамикой Стр.гр. как в образцах с тикагрелором, так и без тикагрелора (табл. 6). Можно было видеть, что благодаря тикагрелору удается стабилизировать значительную часть тромбоцитов с гранулами на поверхности исследуемых субстратов.

Такая возможность стабилизации биологически полноценных тромбоцитов указывает на отсутствие жесткой связи между ранней стадией адгезии (контакт с субстратом, прилипание к нему) и поздней стадией (образование широкой ламеллы и дегрануляция). По всей видимости, реализация этих двух этапов адгезии связано с активацией разных физиологических путей, участвующих в проявлении тромбоцитами их адгезивной активности, поэтому для полноценного проявления адгезивной активности необходима активация всех этих путей, а не только связанных с первичной адгезией на субстрате. Это предположение может, в частности, объяснять такой феномен, как наличие у тромбоцитов человека 2-х типов рецепторов к АДФ, активация которых ведет к двум разным путям запуска активации тромбоцитов. Тикагрелор блокирует P2Y<sub>12</sub>-тип АДФ-рецепторов, задействованных в активации процессов перестройки цитоскелета и выброса содержимого тромбоцитарных гранул [97], т.е. этапов поздней стадии адгезии, когда активация тромбоцита становится необратимой. Ранее нами было показано, что проявление адгезивной активности тромбоцитов на стекле не связано с наличием в среде АДФ [39-41], однако это не препятствует подавлению адгезии активности с помощью тикагрелора. Примечательно, что при использовании выбранной дозы (15 мг/л тикагрелора) стабилизация охватывала большую часть пула тромбоцитов с гранулами, но не весь пул.

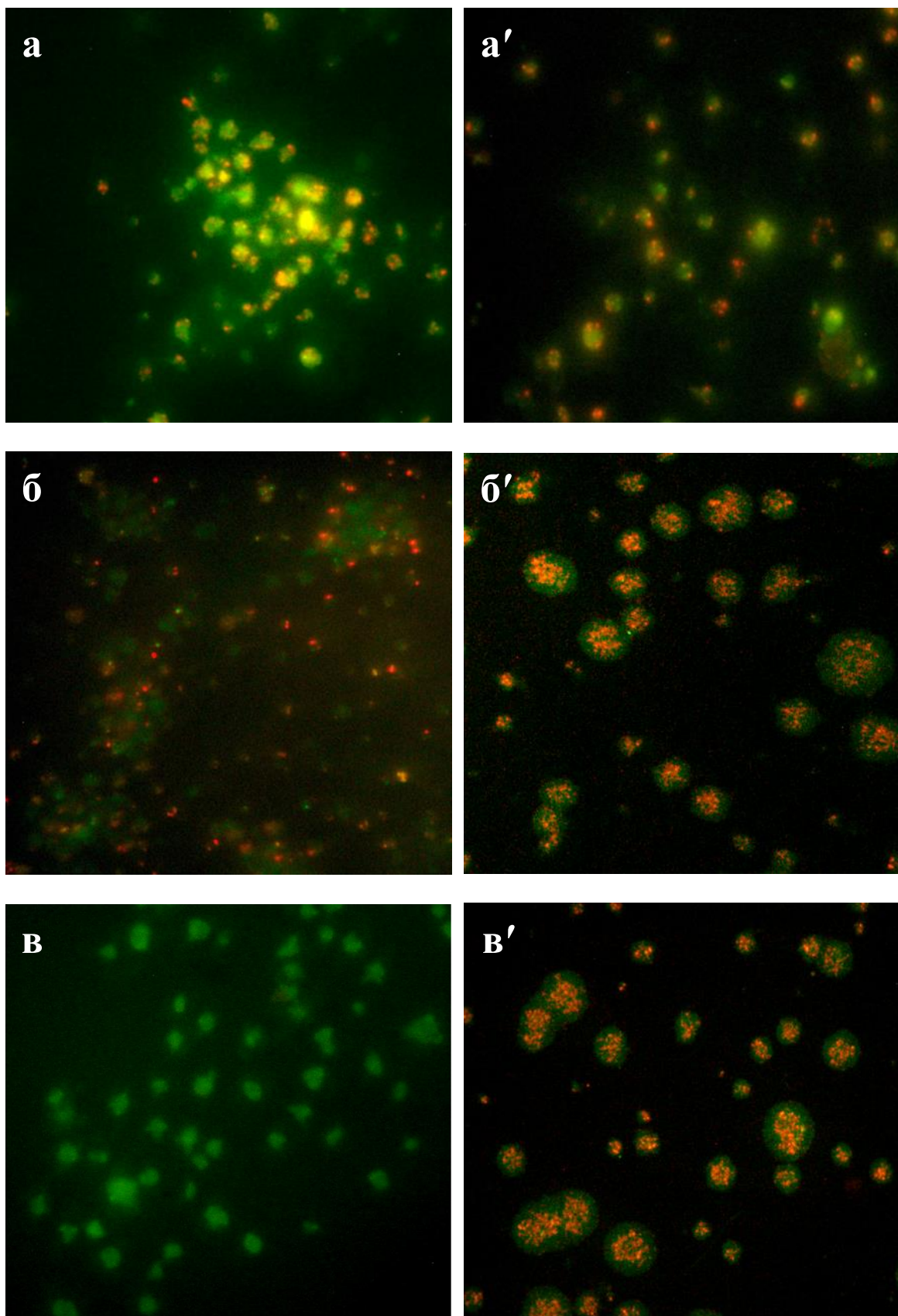


Рисунок 23 – Выявление гранул в составе тромбоцитов, адгезировавших на покровном стекле, на разных сроках экспозиции при 37°C в отсутствие (левый ряд) и в присутствии (правый ряд) 15 мг/л тикагрелора. Витальное окрашивание трипафлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение x1000.  
 а, а' – экспозиция 10 мин; б, б' – экспозиция 1 час; в, в' – экспозиция 24 часа.

Не исключено, что в больших округлых тромбоцитах (находящихся, как принято считать, на ранней стадии активации) подавление адгезивной активности путем блокирования P2Y<sub>12</sub>-рецепторов может быть неэффективным, поскольку такие клетки уже получили сигнал перестройки цитоскелета и активации, не связанный с активацией через P2Y<sub>12</sub>-рецепторы. Также стоит учитывать, что блокировка АДФ-рецепторов не исключает активации тромбоцитов другими способами, включая неканонические. Так, тромбоциты стабилизированные на поверхности коллагена, в присутствии тикагрелора сохраняли гранулы в своем составе в течение 24 часов (рис. 24а), т.е. коллаген не вызывал их необратимой активации, однако при добавлении в среду адреналина (в конечной концентрации 5-10 мкМ) происходила массовая дегрануляция тромбоцитов в течение 10 мин (рис. 24б). Полученные данные говорят о том, что, с одной стороны, анти-агрегантный и анти-адгезивный эффект тикагрелора связан не только с блокадой АДФ-рецепторов, но и с подавлением других путей внутриклеточного сигналинга в тромбоцитах, а с другой – тикагрелор не дает полной и необратимой инактивации тромбоцитов.

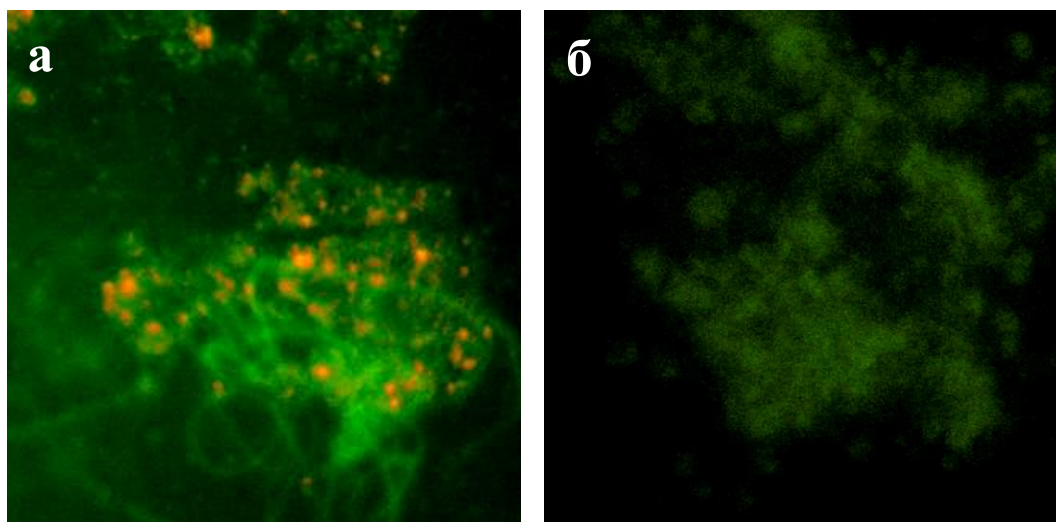


Рисунок 24 – Тромбоциты, стабилизированные на коллагеновой повязке с помощью 15 мг/л тикагрелора, до экспозиции с адреналином (а) и после 10 мин экспозиции с 10 мкМ адреналина (б). Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение x400.

Проведенное исследование показало, что свыше 70% тромбоцитов с гранулами, стабилизированных на поверхности адгезивных субстратов в присутствии тикагрелора, сохраняют целостность внутреннего состава в течение 24 часов при 37°C и не дегранулируют, т.е. использование тикагрелора позволяет достаточно эффективно стабилизировать биологически полноценные тромбоциты на субстрате. С другой стороны, подавляющая часть тромбоцитов с гранулами (свыше 90% от их исходного содержания в БоТП) не адгезировала на субстрате. Это можно объяснить коротким временем экспозиции БоТП с субстратом до внесения тикагрелора в среду и дальнейшим стабилизирующим действием самого препарата. С другой стороны, примечателен тот факт, что в пробах без тикагрелора также не наблюдалось увеличения числа прикрепившихся клеток на поверхности адгезивных субстратов, но при этом резко снижалось содержание функционально пригодных тромбоцитов в среде. Очевидно, такая тотальная активация тромбоцитов в суспензии происходила вследствие выброса факторов активации из гранул адгезировавших тромбоцитов в остальную часть БоТП. Контакт тромбоцитов с коллагеном вызывал быстрое образование очень тесных тромбоцитарных конгломератов, что не позволяло оценить форму клеток в их составе. Похожие конгломераты адгезирующих тромбоцитов можно было видеть и на покровном стекле (рис. 24), однако их размер были меньше, чем при контакте с коллагеном. Предварительная инкубация тромбоцитов с тикагрелором резко снижает их способность к адгезии, поэтому при производстве тромбоцит-насыщенных матриксов необходимо вносить тикагрелор уже после запуска адгезии тромбоцитов. При этом необходимо добиться, чтобы тромбоциты адгезировали на субстрате диффузно (без контакта с другими тромбоцитами) или образовывали некрупные конгломераты, поскольку в крупных скоплениях тромбоциты дегранулируют очень быстро. Контакт тромбоцитов друг с другом напрямую связан с их способностью образовывать ламеллу, поэтому важно было изучить влияние тикагрелора на рост ламеллы в тромбоцитах.



### 5.1.2 Влияние разных доз тикагрелора на формирование тромбоцитарной ламеллы

Антитромботический эффект препаратов-антиагрегантов заключается в снижении суммарной способности тромбоцитарной популяции к агрегации, на фоне сохранения структурной целостности тромбоцитов. Подбор эффективной дозы антиагреганта имеет большое значение для клинической практики, но также это важно для использования тикагрелора в качестве стабилизатора тромбоцитарных гранул. В работе исследовали тромбоциты БотП в присутствии 5-100 мг/л тикагрелора. Дозы 5 и 10 мг/л не оказывали видимого действия на адгезивную активность тромбоцитов – практически все биологически полноценные тромбоциты с гранулами активно адгезировали на стекле и формировали ламеллу. Напротив, в опытах с 25 и 30 мг/л тикагрелора рост ламеллы полностью отсутствовал, одновременно с этим свыше 50% тромбоцитов с гранулами не прилипали к стеклу (табл. 8). Наиболее заметным этот эффект был в опытах с 30 мг/л. В присутствии 35 мг/мл тикагрелора доля тромбоцитов с гранулами, не способных прилипнуть к стеклу, значимо не отличалась от аналогичного показателя при 25 мг/мл, при этом 10% тромбоцитов формировали ламеллу, т.е. 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, т.е. 50-100 мг/л тикагрелора вызывали повреждение тромбоцитов. При этом более 80% тромбоцитов с гранулами могли прилипнуть к стеклу, у 20-30% тромбоцитов с гранулами формировалась ламелла (табл. 7). Таким образом, избыточные дозы тикагрелора уже не оказывают желаемого блокирующего действия на тромбоциты и к тому же могут быть токсичными для тромбоцитов. Для блокировки адгезивной активности тромбоцитов *in vitro* наиболее эффективной является доза 30 мг/л тикагрелора. Эти данные также могут быть использованы при назначении этого препарата в клинической практике.

Таблица 7 – Подавление адгезивной активности тромбоцитов под действием разных доз тикагрелора

Содержание тикагрелора в образце, мг/л	Число наблюдений	Морфофункциональные параметры тромбоцитов Me [25%; 75%]		
		Доля тромбоцитов с гранулами, не адгезировавших на стекле, %	Доля клеток с ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов, %	МФАТ адгезировавших тромбоцитов, баллы
5	n=10	0 [0;0]*	93 [92;96]*	21 [20; 21]*
10	n=9	0 [0;0]*	93 [91;96]*	24 [23;25]*
15	n=10	35 [33;36]	27 [25;38]	49 [48;51]
25	n=10	54 [52;55]*	0 [0;0]*	50 [48;53]
30	n=10	78 [75;80]*	0 [0;0]*	50 [48;52]
35	n=10	53 [50;57]*	10 [10;12]*	50 [47;52]
50	n=9	20 [11;30]*	30 [27;32]*	35 [32;37]*
100	n=12	10 [8;11]*	23 [22; 25]*	34 [33;35]*

\*p<0,05 относительно опыта с 15 мг/л тикагрелора (критерий Манна-Уитни)

## 5.2 Морфофункциональные свойства тромбоцитов человека в условиях контакта с наночастицами серебра

Коллоидные наноструктурированные суспензии на основе серебра уже довольно долго используются во многих медико-биологических исследованиях. Широко описано бактерицидное действие покрытий с наносеребром [283], есть данные о том, что содержащее наносеребро трансплантаты обладают репаративным и регенеративным эффектами [100]. Благодаря своей высокой проникающей способности наночастицы серебра в условиях *in vivo* способны контактировать с клетками разных типов, в том числе – с тромбоцитами человека. При этом данные о воздействии наночастиц серебра на морфофункциональный статус тромбоцитов являются довольно противоречивыми. В этой связи необходимо было изучить структурную целостность и функциональную активность тромбоцитов человека под действием разных концентраций наночастиц серебра.

При внесении в БоТП и КТ 0,05-5 мкМ наночастиц серебра с последующим хранением в течение 24 часов не наблюдалось видимого изменения структуры тромбоцитов как при 22°C (рис. 25а, б), так и при 37°C.

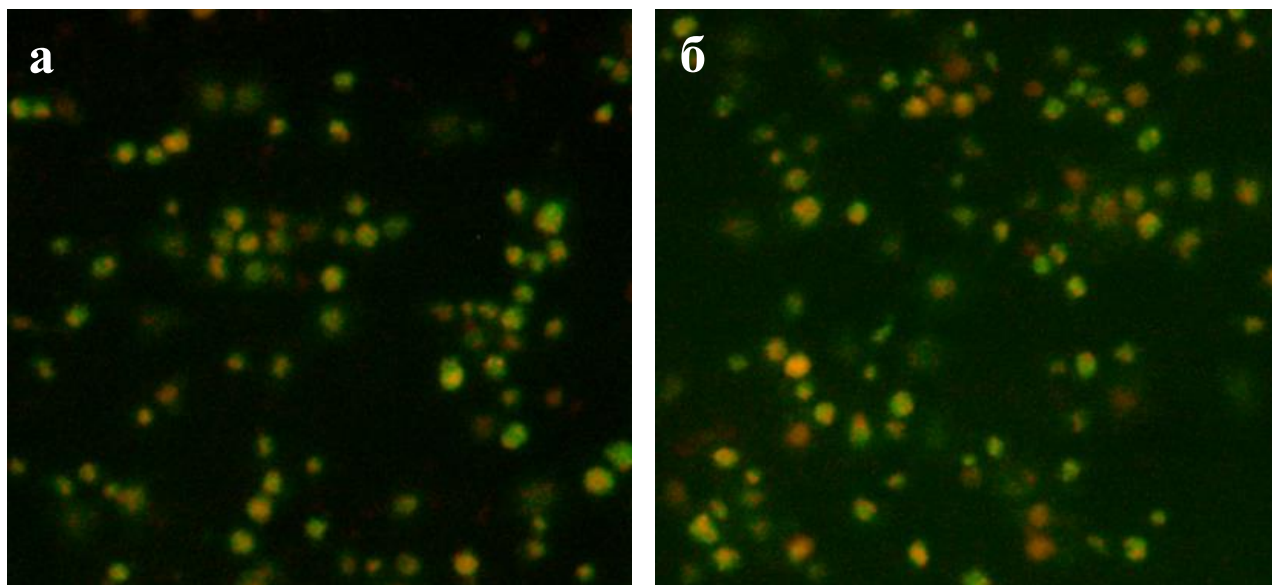


Рисунок 25 – Инкубация тромбоцитов человека с наночастицами серебра при 22°C. Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение x800. а – тромбоциты перед инкубацией; б – тромбоциты через 24 часа инкубации в присутствии 5 мкМ наносеребра

Исходное содержание тромбоцитов с гранулами в БоТП и КТ составляло в среднем  $64,5 \pm 4,0\%$ , через 24 часа хранения КТ значение этого параметра составило  $62,1 \pm 4,2\%$  в пробах без наночастиц серебра и  $61,8 \pm 4,1\%$  в опытных пробах, т.о. длительная экспозиция с 0,05-5 мкМ наночастиц серебра не нарушала структурной целостности тромбоцитов. Общий рисунок распределения гранул в составе тромбоцитов не менялся, все тромбоциты с гранулами сохраняли способность к адгезии на субстрате. Однако детальный микроскопический анализ показал, что внутриклеточные процессы, происходящие в адгезирующих тромбоцитах, могут сильно различаться при разных концентрациях наночастиц. Так, концентрации 0,05-0,1 мкМ наносеребра совершенно не влияли на рост ламеллы адгезирующих тромбоцитов,

стабилизация гранул внутри тромбоцитов также практически отсутствовала. При увеличении концентрации наносеребра от 1 до 5 мкМ в КТ наблюдалось постепенное увеличение числа клеток, неспособных формировать ламеллу (табл. 8), т.е. в данном случае имел место выраженный дозозависимый эффект подавления адгезии тромбоцитов, ранее описанный в литературе [103, 273]. Одновременно с этим увеличивалось число клеток, в которых при адгезии на стекле полностью или частично сохранялись гранулы. Наибольший объем гранул в тромбоцитах после адгезии на стекле 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 (табл. 8). При этом гранулы выявлялись как в центральной части цитоплазмы тромбоцитов, так и на периферии (рис. 26). 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 значимо (табл.8). Следовательно, наиболее оптимальное время предварительной инкубации тромбоцитов с целью стабилизации гранул внутри цитоплазмы составляет 1 час.

При концентрации наночастиц серебра 15 мкМ и выше у тромбоцитов с гранулами полностью подавлялась способность к образованию ламеллоподий. Вместе с тем, при таком уровне наносеребра в КТ отмечена спонтанная активация тромбоцитов, которая сопровождалась их массовой дегрануляцией и образованием тромбофибриновых сгустков. При 22°C изменения, связанные с дегрануляцией (смещение гранул к периферии тромбоцитов, связывание их с плазматической мембраной) выявлялись уже через 30-60 мин, в некоторых случаях в этот период дегранулировали до 90% клеток.

Таблица 8 – Влияние инкубации тромбоцитных концентратов с разным содержанием наночастиц серебра при 22°С на адгезивные характеристики тромбоцитов человека

Время предварительной инкубации с наносеребром	Морфофункциональные параметры, М±σ			
	Доля клеток с ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов, %	Доля адгезировавших тромбоцитов, содержащих более 3 гранул %	МФАТ адгезировавших тромбоцитов, баллы	Сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах, %
Концентрация наносеребра 0,05-0,1 мкМ				
60 мин (n=40)	94,5±0,9	1,5±0,1	22,1±0,1	4,2
120 мин (n=40)	96,0±0,9	1,2±0,2	22,5±0,1	5,0
Концентрация наносеребра 1,0-1,5 мкМ				
60 мин (n=50)	85,4±1,1*	50,6±0,8*	35,6±0,5*	31,4
120 мин (n=50)	81,2±1,0*	48,5±1,0*	34,3±0,6*	28,6
24 часа (n=40)	81,0±0,8	48,0±0,5	34,0±0,8	28,0
Концентрация наносеребра 2,5 мкМ				
60 мин (n=50)	62,5 ±0,8* <sup>+</sup>	70,8±0,8* <sup>+</sup>	45,5±2,6* <sup>+</sup>	50,0
120 мин (n=48)	10,7±0,9* <sup>+</sup>	70,0±1,7* <sup>+</sup>	42,1±0,7* <sup>+</sup>	44,2
24 часа (n=43)	10,0±0,7 <sup>+</sup>	69,0±0,7 <sup>+</sup>	41,8±1,0 <sup>+</sup>	43,6
Концентрация наносеребра 5 мкМ				
60 мин (n=50)	50,5±0,8*	70,5±1,0*	36,0±1,4*	32,0
120 мин (n=50)	5,3±1,2* <sup>+</sup> #	60,6±1,8* <sup>+</sup> #	30,0±1,0* <sup>+</sup> #	20
24 часа (n=40)	5,2±0,4 <sup>+</sup> #	60,0±1,4 <sup>+</sup> #	30,0±1,0 <sup>+</sup> #	20
Концентрация наносеребра 15 мкМ				
60 мин(n=50)	0* <sup>+</sup> #&	10,4±1,3* <sup>+</sup> #&	22,5±1,0 <sup>+</sup> #&	5,0
120 мин (n=50)	0* <sup>+</sup> #&	0* <sup>+</sup> #&	22,0±0,1 <sup>+</sup> #&	0
<p>*p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 0,05-0,1 мкМ наносеребра  <sup>+</sup> p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 1,0-1,5 мкМ наносеребра  <sup>#</sup> p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 2,5 мкМ наносеребра  <sup>&amp;</sup> p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 5 мкМ наносеребра  (t-критерий Стьюдента)  n – число наблюдений</p>				

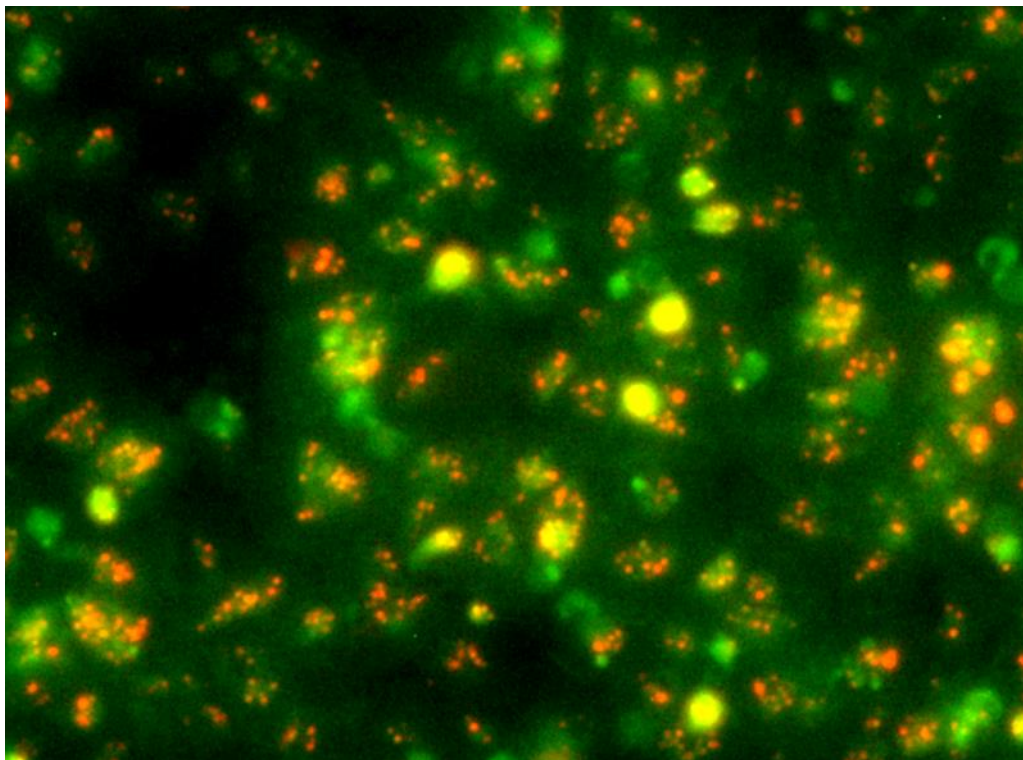


Рисунок 26 – Тромбоциты, предварительно инкубированные с 2,5 мкМ наносеребра в течение 1 часа при 22°C, через 2 часа после адгезии на стекле. Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение x2000.

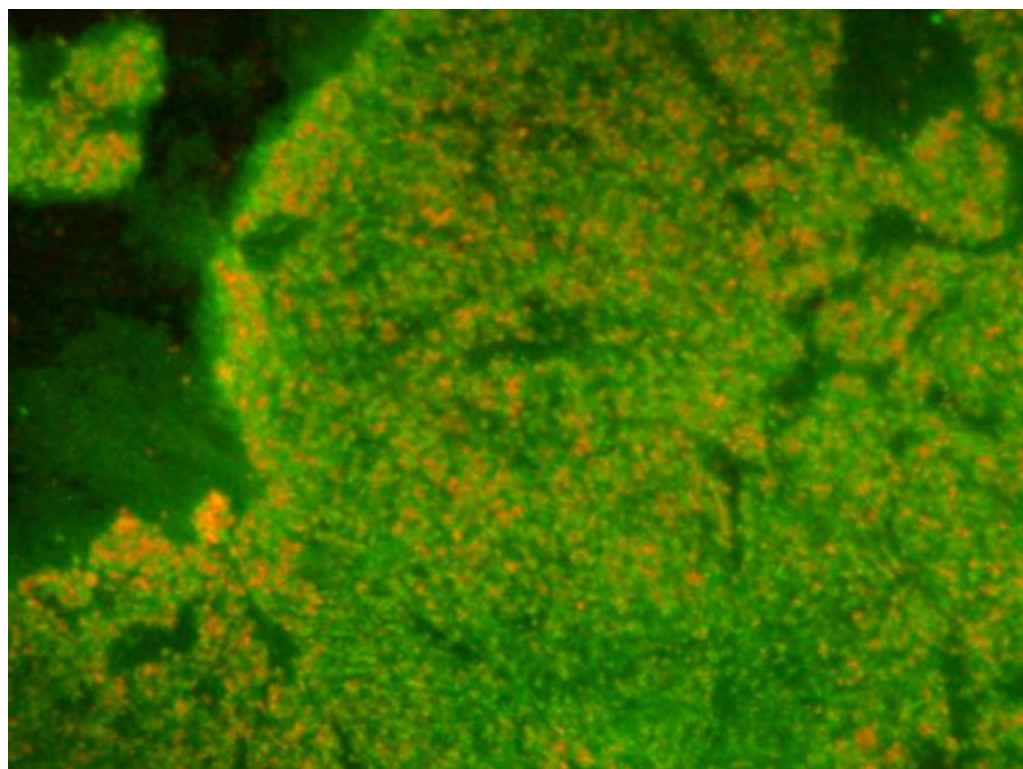


Рисунок 27 – Формирование крупных тромбоцитарных агрегатов через 2 часа инкубации тромбоцитов человека с 100 мкМ наносеребра при 22°C. Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение x400.

Полная дегрануляция тромбоцитов при 22°C наступала при 15 мкМ наночастиц серебра через 24 часа, а при 25-100 мкМ – через 2-4 часа. Этот процесс был значительно ускорен при температуре 37°C: при 15 мкМ наносеребра тромбоциты выбрасывали все гранулы в течение 2 часов, при 25-100 мкМ – в течение всего лишь 10-15 минут. В КТ, содержащих 100 мкМ наночастиц серебра, в условиях 22°C первоначально образовывались очень крупные тромбоцитные агрегаты до 1000 мкМ диаметром (рис. 27). Однако через 4-5 часов при 22°C такие крупные агрегаты распадались на множество мелких диаметром 10-15 мкМ на фоне полной дегрануляции клеток в их составе. В условиях 37°C подобной дезагрегации тромбоцитов в КТ с 100 мкМ наночастиц серебра не происходило.

Во 2-й серии экспериментов установлено, что добавление наносеребра в концентрации 0,05-5 мкМ к адгезирующим на стекле тромбоцитам практически не влияет на их способность к образованию ламеллы. Даже после 24 часов экспозиции доля тромбоцитов с гранулами без выраженной ламеллы не превышала 10% (табл. 9). С другой стороны, рост ламеллы не препятствовал сохранению гранул в адгезирующих тромбоцитах (рис. 28а, б). Как и в случае предварительной инкубации (1 серия экспериментов), сохранность гранул в тромбоцитах при 0,05-5 мкМ наносеребра носила дозозависимый характер. Наибольшее значение  $S_{хгр}$  выявлено в образцах КТ, стабилизированных с помощью 5 мкМ наночастиц серебра. Через 1-2 часа инкубации тромбоциты сохраняли 75-77% гранул, а через 24 часа - около 70%. Стоит особо подчеркнуть, что в присутствии 1-5 мкМ наносеребра частичная дегрануляция тромбоцитов, адгезирующих на стекле, не сопровождалась дегрануляцией тех тромбоцитов, которые оставались в суспензии и не успели еще адгезировать.

Таблица 9 – Стабилизация адгезировавших тромбоцитов разными концентрациями наночастиц серебра при 37°C

Время инкубации с наносеребром	Морфофункциональные параметры, М±σ			
	Доля клеток с ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов, %	Доля адгезировавших тромбоцитов, содержащих более 3 гранул, %	МФАТ адгезировавших тромбоцитов, баллы	Сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах, %
Концентрация наносеребра 0,05-0,1 мкМ				
60 мин (n=30)	96,0±1,2	0	20,0±0,2	0
120 мин (n=20)	98,4±1,3	0	20,0±0,2	0
Концентрация наносеребра 1,0-1,5 мкМ				
60 мин(n=40)	95,2±1,3	27,6±1,1	35,6±0,9	31,2
120 мин (n=40)	92,3±1,2*	10,6±1,3*	33,0±0,7*	20,0
24 часа (n=27)	91,2±0,8	10,0±1,5*	30,0±0,9*	20,0
Концентрация наносеребра 2,5 мкМ				
60 мин (n=40)	95,1±1,2*	51,2±1,0* <sup>+</sup>	50,2±1,3* <sup>+</sup>	60,4
120 мин (n=40)	92,6±2,3*	40,8±1,2* <sup>+</sup>	43,5±1,0* <sup>+</sup>	47
24 часа (n=28)	90,5±1,0	40,4±0,6 <sup>+</sup>	42,5±1,0 <sup>+</sup>	45
Концентрация наносеребра 5 мкМ				
60 мин (n=40)	95,0±1,3	78,2±1,4* <sup>+#</sup>	58,6±1,6* <sup>+#</sup>	77,2
120 мин (n=40)	95,0±0,4*	76,2±1,0* <sup>+#</sup>	57,7±0,9* <sup>+#</sup>	75,0
24 часа (n=25)	94,2±0,5 <sup>+#</sup>	70,2±0,6 <sup>+#</sup>	55,3±0,6 <sup>+#</sup>	70,6
Концентрация наносеребра 15 мкМ				
60 мин (n=24)	0* <sup>+#&amp;</sup>	30,7±1,0* <sup>+#&amp;</sup>	37,5±1,1* <sup>+#&amp;</sup>	35,0
120 мин (n=20)	0* <sup>+#&amp;</sup>	0 <sup>+#&amp;</sup>	20,0±0,2 <sup>+#&amp;</sup>	0
<p>*p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 0,05-0,1 мкМ наносеребра  <sup>+</sup> p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 1,0-1,5 мкМ наносеребра  <sup>#</sup> p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 2,5 мкМ наносеребра  <sup>&amp;</sup> p&lt;0,05 относительно аналогичного опыта при 5 мкМ наносеребра  (t-критерий Стьюдента)  n – число наблюдений</p>				



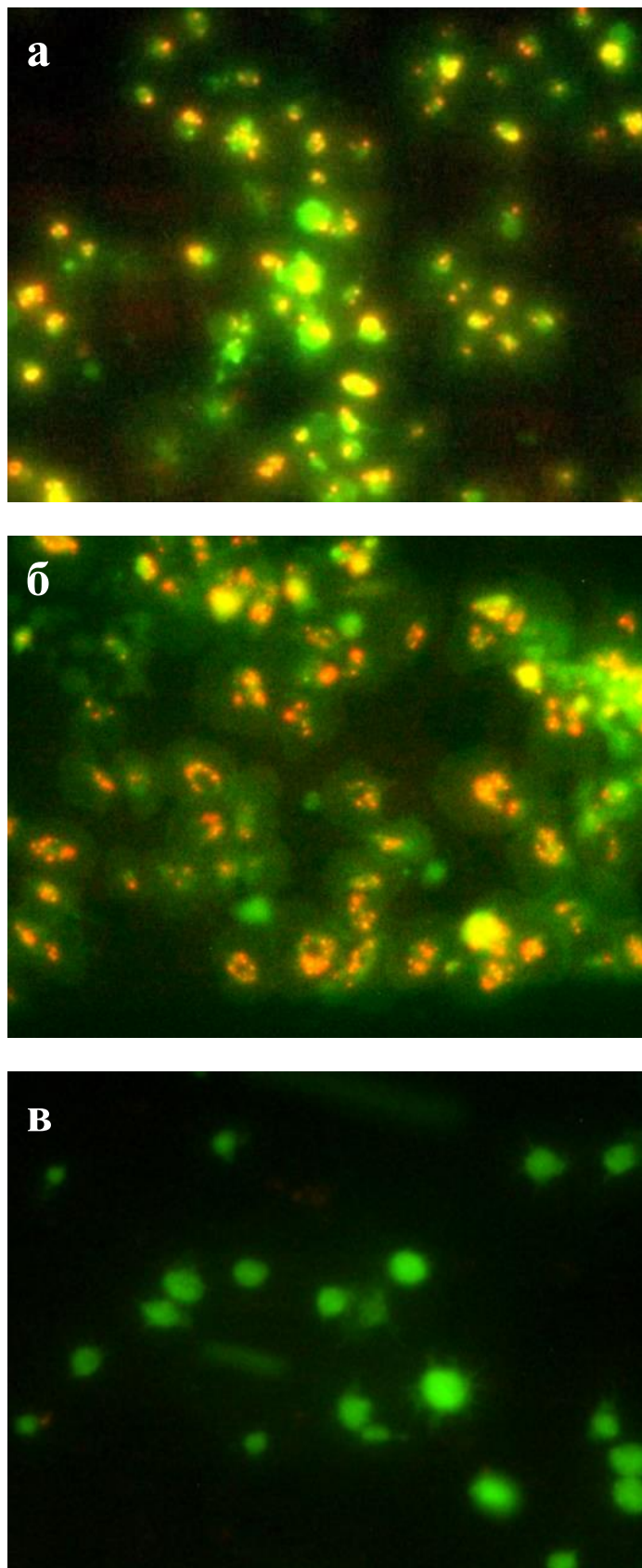


Рисунок 28 – Адгезирующие на стекле тромбоциты через 2 часа после обработки буферным раствором с разной концентрацией наночастиц серебра (а – 1,5 мкМ, б – 5 мкМ, в – 15 мкМ). Окраска триафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение x2000.

Добавление к адгезирующим тромбоцитам наносеребра в концентрации 15 мкМ и выше вызывало неоднозначный эффект. С одной стороны, при 15 мкМ наносеребра полностью подавлялась способность адгезирующих тромбоцитов образовывать ламеллу. С другой стороны, отмечена спонтанная и быстрая дегрануляция всех биологически полноценных клеток (рис. 28в). Через 10-30 мин после инкубации с высокими дозами наносеребра тромбоциты на стекле уже совершенно не содержали гранул, при том, что в них отсутствовали изменения, связанные с распластыванием на субстрате. Можно заключить, что блокировка адгезивной активности тромбоцитов не всегда является препятствием для экзоцитоза их гранул. Стабилизация адгезировавших тромбоцитов с помощью 1-5 мкМ наносеребра позволяет сохранить значительную часть гранул в их составе, т.е. фактически позволяет затормозить тромбоциты на ранней стадии активации. Вместе с тем, стабилизированные наносеребром тромбоциты свободно дегранулировали под действием неканонических факторов активации. В частности, добавление к таким препаратам слабогипотоничного раствора хлорида натрия (0,1 М NaCl) приводило к выбросу всех гранул за пределы клеток. Таким образом, стабилизация тромбоцитов человека с помощью наночастиц не препятствует запуску тех механизмов активации, которые напрямую не связаны с адгезией на субстрате.

Необходимо особо описать рисунок распределения гранул в стабилизированных тромбоцитах. Анализ витально окрашенных препаратов показал, что при 5 мкМ наносеребра основная часть гранул сохранялась в центральной части цитоплазмы (в зоне т.н. грануломера), а периферия клетки, включая зону ламеллы, почти не содержала гранул (рис. 28б). С другой стороны, при более низких концентрациях наносеребра (1-2,5 мкМ) стабилизированные гранулы в равной степени выявлялись как в центральной части, так и на периферии тромбоцита; часто можно видеть гранулы, уже частично вышедшие за пределы клетки, связанные с ней лишь узким мостиком цитоплазмы (рис. 27а). Это наблюдение позволяет предположить, что в процессе дегрануляции

тромбоцитов экзоцитоз гранул сначала идет через периферические области тромбоцита, его ламеллу, и лишь затем гранулы выделяются из центральной зоны (зоны грануломера). Известно, что гранулы тромбоцитов, содержащие разные вещества, экзоцитируются в разное время – в частности, фактор роста сосудов VEGF секретируется тромбоцитами на более ранних сроках активации, нежели факторы свертывания крови [244]. При этом концентрации наносеребра 1-5 мкМ дозозависимо повышают объем гранул, стабилизированных в грануломере.

Проведенное исследование показало, что разные концентрации наночастиц серебра позволяют стабилизировать разный объем гранул в адгезирующих тромбоцитах. Можно предположить, что использование наносеребра позволит стимулировать сохранение или, напротив, выделение гранул с компонентами нужного типа. Однако для такого подхода требуется более детально изучить распределение в тромбоцитах гранул с разным химическим составом, а также динамику их экзоцитоза во время адгезии.

### **5.3 Стабилизация тромбоцитов с помощью перекиси водорода**

#### **5.3.1 Изменение морфофункционального статуса тромбоцитов человека под действием перекиси водорода**

Высокие концентрации перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) обладают выраженным прокоагулянтным эффектом. Показано, что под действием 600-2000 мкМ в мл  $H_2O_2$  происходит спонтанная агрегация тромбоцитов *in vitro* и *in vivo* [65, 66]. С другой стороны, в присутствие 50-80 мкМ  $H_2O_2$  тромбоциты частично теряют способность к агрегации, индуцированной стандартными индукторами (АДФ, адреналин) [8,9]. При этом не изучено влияние  $H_2O_2$  на морфофункциональный статус тромбоцитов.

В присутствии 20-80 мкМ  $H_2O_2$  не наблюдалось видимых изменений структуры тромбоцитов как при 22°C, так и при 37°C. Биологически полноценные тромбоциты (клетки с гранулами) сохраняли весь объем гранул в

составе цитоплазмы. Содержание тромбоцитов с гранулами и их адгезивная активность при 20-80 мкМ  $H_2O_2$  также не изменялись. 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. В результате через 2 часа уже все тромбоциты не содержали гранул и не были способны к адгезии (рис. 29), 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. Полная дегрануляция агрегирующих тромбоцитов наступала через 30-60 мин. Нужно особо подчеркнуть, что после внесения 400-600 мкМ  $H_2O_2$  в пробы, где все клетки изначально не содержали гранул, агрегация тромбоцитов не происходила. Это говорит о том, что агрегация тромбоцитов под действием высоких доз  $H_2O_2$  напрямую связана с наличием в них гранул.

Обработка тромбоцитов на ранних стадиях адгезии низкими дозами  $H_2O_2$  не препятствовала дальнейшей адгезии и дегрануляции тромбоцитов. При 20-80 мкМ  $H_2O_2$  тромбоциты активно адгезировали на предметном стекле, через 1 час экспозиции при 37°C число адгезировавших на стекле клеток составляло в среднем 105 тыс/см<sup>2</sup> и соответствовало тому, что наблюдается при аналогичном процессе в отсутствие  $H_2O_2$ . Параллельно с этим в адгезирующих тромбоцитах наблюдалось постепенное смещение всех гранул к периферии и их выброс за пределы клетки. Можно заключить, что концентрации 20-80 мкМ  $H_2O_2$  не способны стабилизировать гранулы в тромбоцитах, которые уже начали адгезировать. Стоит особо отметить, что в пробах с 60-80 мкМ  $H_2O_2$  на фоне дегрануляции адгезирующих тромбоцитов не наблюдалось тотальной активации тромбоцитов в суспензии (рис. 30).

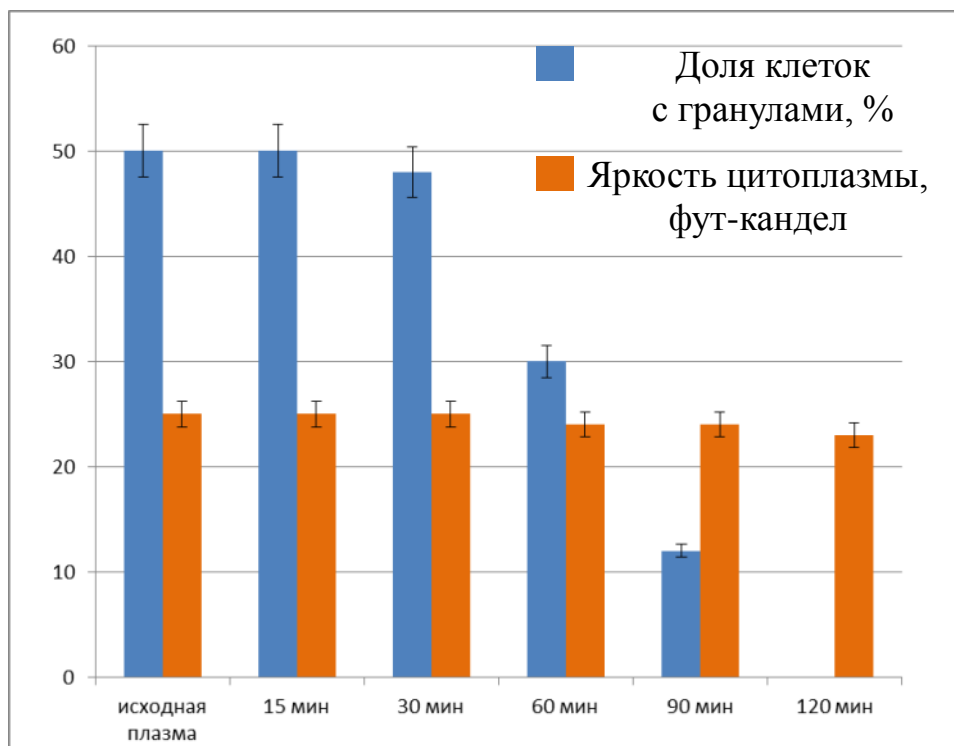


Рисунок 29 – Изменение морфофункционального статуса тромбоцитов человека под действием 400 мкМ  $H_2O_2$ .

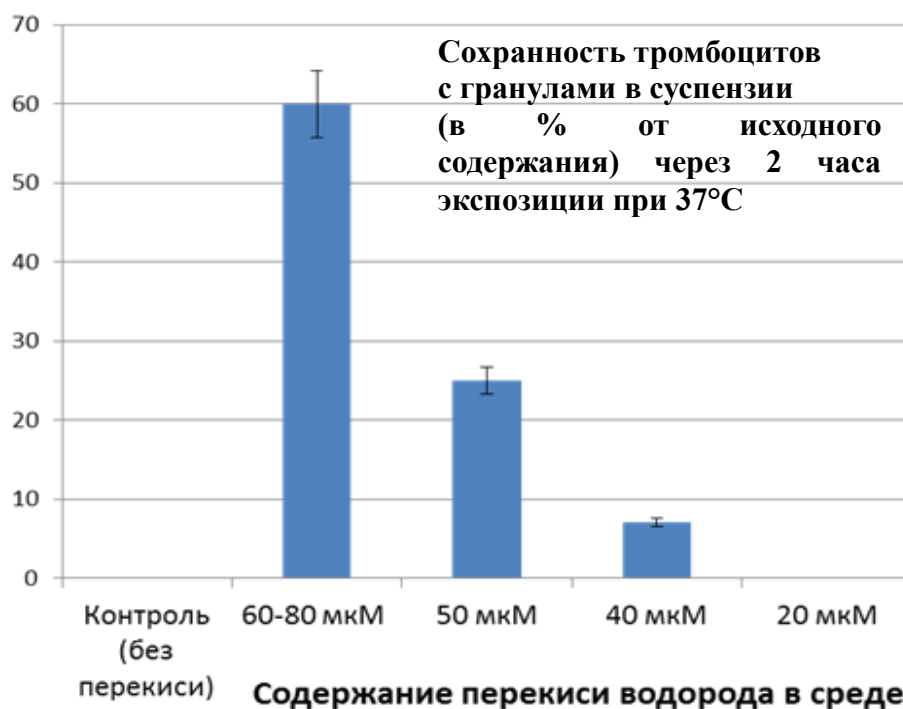


Рисунок 30 – Влияние низких доз  $H_2O_2$  на активацию тромбоцитов с гранулами в суспензии.

Если до начала эксперимента содержание тромбоцитов с гранулами в суспензии составляло в среднем  $56 \pm 4\%$ , то через 2 часа экспозиции при 60-80 мкМ  $H_2O_2$  это значение составило  $34 \pm 2\%$ . Таким образом, в суспензии порядка 50-70% от всего числа тромбоцитов с гранулами оставались на стадии «покоя», сохраняя свою внутреннюю целостность и способность к адгезии. В условиях 40-50 мкМ  $H_2O_2$  этот эффект был выражен гораздо слабее – при 50 мкМ в суспензии сохранялось 20-30% от исходного числа тромбоцитов с гранулами, при 40 мкМ – всего 5-8%. При 20 мкМ  $H_2O_2$  все тромбоциты в суспензии полностью дегранулировали, также как и адгезирующие тромбоциты.

Таким образом, нам не удалось добиться выраженной стабилизации гранул в тромбоцитах с помощью низких доз перекиси. С другой стороны, необходимо подчеркнуть, что исходный 3%-ный раствор перекиси вводился непосредственно в экспериментальные пробы без предварительного разведения плазмой или физраствором. Не исключено, что при таком введении молекулы  $H_2O_2$  первоначально оказывают активирующее или слабоактивирующее воздействие, которое препятствует дальнейшей стабилизации тромбоцитов при их адгезии. Перекись водорода обладает высокой проникающей способностью внутрь клеточных мембран и способна запускать каскад внутриклеточного сигналинга уже в первые минуты контакта с тромбоцитами [75]. Вместе с тем, нужно подчеркнуть, что в условиях 40-80 мкМ дегрануляция адгезирующих тромбоцитов не вызывала массовой дегрануляции тромбоцитов в суспензии, которая обычно происходит при контакте плазмы с адгезивным субстратом [41]. Поэтому можно предположить, что при оптимальном способе введения перекиси в плазму с тромбоцитами возможно достичь стабилизации их гранул.

### **5.3.2 Возможность стабилизации тромбоцитов путем предварительной инкубации с низкими дозами перекиси водорода**

Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили после инкубации образцов БоТП с 20-75 мкМ  $H_2O_2$ , параллельно исследовали БоТП без  $H_2O_2$ . В тромбоцитах обследованных БоТП значения МФАТ варьировали от 65 до 100

баллов, значения Яцит – от 25 до 35 баллов, средние значения МФАТ и Яцит составили 77 [74; 81] и 31 [30; 32] баллов соответственно. Средний уровень тромбоцитов с гранулами в плазме исходно составлял 52 [47; 55] %. В процессе экспозиции образцов БоТП с 20-75 мкМ  $H_2O_2$  при 20-22°C в течение 24 часов значимого изменения уровня тромбоцитов с гранулами не наблюдалось, структурная целостность и яркость окрашенных клеток в опытных БоТП были такими же, как в контроле. При анализе адгезивной активности на стекле установлено, что концентрация 20 мкМ  $H_2O_2$  практически не влияет на рост ламеллы адгезирующих тромбоцитов и их дегрануляцию. Через 1 час адгезии на стекле тромбоциты БоТП, предварительно инкубированной с 20 мкМ  $H_2O_2$ , выбрасывали все гранулы, формировали обширную ламеллу, тесно контактировали друг с другом, как и в случае адгезии тромбоцитов контрольной БоТП (рис. 31а,б). Напротив, при концентрациях  $H_2O_2$  30 мкМ и выше значительная часть тромбоцитов утрачивала способность формировать ламеллу при адгезии, многие адгезировавшие клетки располагались на стекле дискретно и не контактировали друг с другом (рис. 31в-д). Одновременно с этим часть объема гранул сохранялась в адгезирующих тромбоцитах (табл. 10). Наибольшая сохранность тромбоцитарных гранул отмечена в образцах, инкубированных с 60 мкМ  $H_2O_2$ , составляя 59% (рис. 31б, табл. 10). 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 (табл. 10). Необходимо особо подчеркнуть, что указанные эффекты проявлялись, если время предварительной инкубации БоТП с 30-75 мкМ  $H_2O_2$  составляло не менее 30 мин. Инкубация БоТП с  $H_2O_2$  в течение 5-10 мин не позволяла сохранить гранулы в адгезирующих тромбоцитах и не подавляла рост ламеллы. Между пробами, инкубированными 30 мин и 1-2 часа, не было выявлено статистически достоверного различия ( $p > 0,05$ ). В пробах, инкубированных с 30-75 мкМ  $H_2O_2$  в течение 24 часов, сохранность гранул в адгезирующих

тромбоцитах была в среднем в 1,6 раза ниже, чем в пробах, инкубированных 30 мин и 1-2 часа ( $p < 0,05$ ).

Таблица 10 – Морфофункциональный анализ адгезии тромбоцитов, предварительно инкубированных с низкими концентрациями  $H_2O_2$  в течение 30 мин

Концентрация $H_2O_2$ в БоТП	Морфофункциональные параметры адгезирующих тромбоцитов через 1 час адгезии при 37°C (Me [25%; 75%])			
	Доля клеток с ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов, %	Доля клеток с гранулами среди адгезировавших тромбоцитов, %	МФАТ адгезировавших тромбоцитов, баллы	Сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах, %
Контроль (без $H_2O_2$ ) n=18	93 [90; 95]	0 (отсутствовали во всех опытах)	32 [30; 33]	0
20 мкМ n=14	92 [90; 94]	0 (отсутствовали во всех опытах)	32 [28; 34]	0
30 мкМ n=16	40 [38;42]*	41 [38;42]*	48 [44; 53]*	39
45 мкМ n=16	31 [30; 35]* <sup>+</sup>	58 [55;63]* <sup>+</sup>	52 [51;56]* <sup>+</sup>	45
60 мкМ n=16	21 [19;22]* <sup>+#</sup>	67 [65;70]* <sup>+#</sup>	60 [54; 66]* <sup>+#</sup>	59
75 мкМ n=14	23 [22;25]* <sup>+#</sup>	62 [60;63]* <sup>+</sup>	52 [50;56]* <sup>+</sup>	44
* $p < 0,05$ относительно контроля (критерий Манна-Уитни) + $p < 0,05$ относительно опыта с 30 мкМ $H_2O_2$ (критерий Манна-Уитни) # $p < 0,05$ относительно опыта с 45 мкМ $H_2O_2$ наносеребра (критерий Манна-Уитни) n – число наблюдений				

Можно заключить, что 30 мин экспозиции в присутствии низких концентраций  $H_2O_2$  является оптимальным для стабилизации тромбоцитарных гранул. С другой стороны, увеличение сроков экспозиции адгезирующих тромбоцитов на стекле при 37°C постепенно снижало уровень гранул в их составе. Так, через 2 часа контакта со стеклом доля клеток с гранулами среди адгезирующих тромбоцитов при 30 мкМ  $H_2O_2$  составила 22 [19;24]%, при 45 мкМ – 30 [25;32] %, при 60 мкМ – 51 [47;53] %, при 75 мкМ – 32 [30;35] %. Таким образом, при всех концентрациях  $H_2O_2$ , за исключением 60 мкМ, сохранность гранул в адгезирующих тромбоцитах через 2 часа адгезии была



заметно ниже, чем через 1 час ( $p < 0,05$ ). Можно заключить, что концентрация 60 мкМ  $H_2O_2$  является наиболее оптимальной для стабилизации тромбоцитарных гранул. При этом стоит отметить, что стабилизирующий эффект низких доз  $H_2O_2$  не был необратимым. Так, добавление в среду адреналина в конечной концентрации 5 мкМ во всех опытных образцах вызывало массовую дегрануляцию адгезировавших тромбоцитов в течение 5-10 мин, которая сопровождалась ростом ламеллоподий, однако их площадь была заметно меньше чем у клеток в контроле (рис. 31а,е).

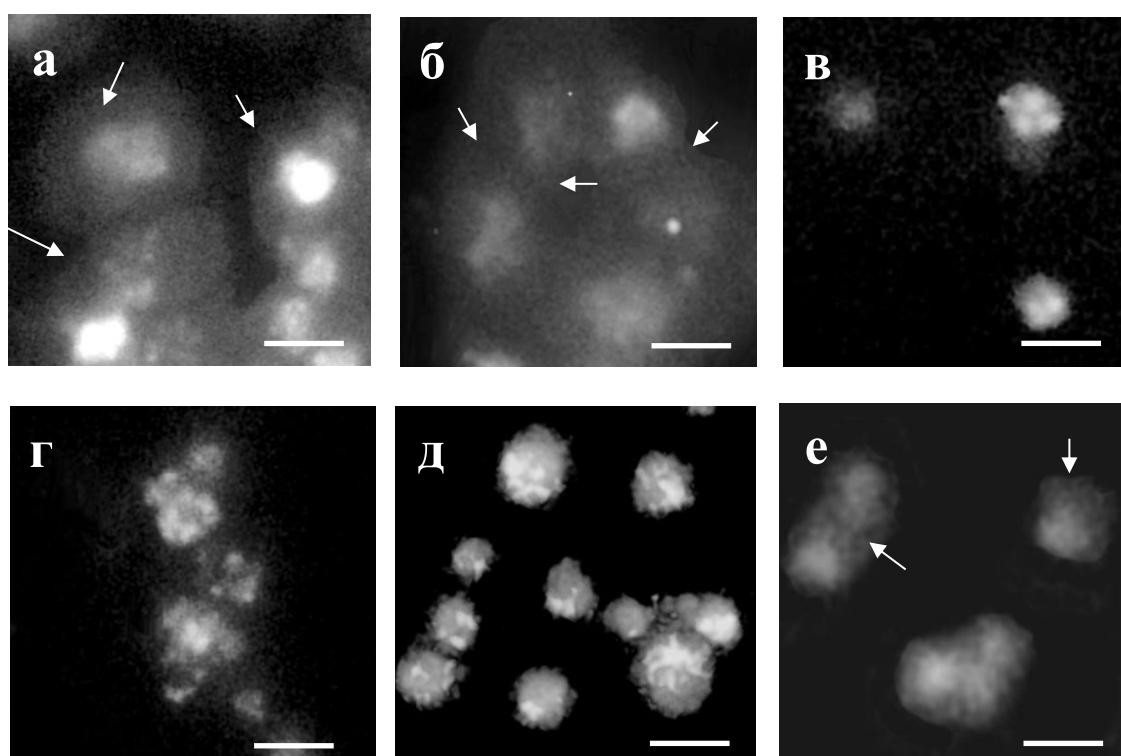


Рисунок 31 – Тромбоциты, предварительно инкубированные с низкими дозами  $H_2O_2$ , через 1 час адгезии на стекле. Масштабная линия 5 мкМ.

а – тромбоциты без предварительной инкубации с  $H_2O_2$  (контроль); б – 20 мкМ  $H_2O_2$ ; в – 30 мкМ  $H_2O_2$ ; г – 45 мкМ  $H_2O_2$ ; д – 60 мкМ  $H_2O_2$ ; е – тромбоциты, инкубированные с 60 мкМ  $H_2O_2$ , после воздействия 5 мкМ адреналина.

Стрелками показана зона ламеллы и ламеллоподий.

Перекись водорода значительно влияет на баланс окисленных и восстановленных структур (редокс-потенциал) как в отдельных клеточных компартментах, так и в клетке в целом. Под действием  $H_2O_2$  редокс-потенциал

клетки смещается в область положительных значений, которые часто наблюдаются при старении клеток, при апоптозе и других патофизиологических процессах [214]. В тромбоцитах молекулы  $H_2O_2$  принимают участие в запуске каскада активации [130, 251]. Смещение редокс-потенциала в отрицательную область вызывает превращение молекул  $H_2O_2$  в молекулы  $H_2O$  и ингибирует активирующее действие перекиси. Однако стоит подчеркнуть, что при высоких отрицательных значениях редокс-потенциала в составе тромбоцитарных интегринавых белков происходит массовый переход -S-S-связей в -SH группы, что стимулирует адгезию и агрегацию тромбоцитов [112, 214]. Не исключено, что при активации тромбоцитарных рецепторов адгезии окружающая их среда обладает восстановительными свойствами, тогда как перекись водорода резко снижает восстановительные свойства среды. Можно предположить, что в условиях 30-75 мкМ  $H_2O_2$  тромбоцитарные рецепторы не способны массово переходить в активное состояние, что препятствует быстрой адгезии тромбоцитов на субстрате, и, соответственно, препятствует дегрануляции тромбоцитов. В результате часть гранул сохраняется в адгезирующих тромбоцитах в течение длительного времени. Вместе с тем, необходимо учитывать, что активный рост ламеллы в некоторых случаях препятствует быстрой дегрануляции, т.е. тромбоциты,севшие на субстрат и не образующие ламеллы, могут дегранулировать скорее, нежели клетки, у которых наблюдается рост ламеллы. Проведенное исследование показало, что 30-75 мкМ  $H_2O_2$  в значительной степени ингибируют рост тромбоцитарной ламеллы, максимальная сохранность гранул сопоставима с той, что наблюдалась в случае предварительной инкубации тромбоцитов с 2,5 мкМ наносеребра. В то же время, при добавлении 2,5-5,0 мкМ наносеребра к тромбоцитам, которые уже начали адгезировать, конечная сохранность гранул превышает 70% на фоне сохранения роста ламеллы. Таким образом, подавление роста ламеллы не означает полной инактивации тромбоцитов. Более того, воздействие активирующих доз адреналина вызывает быструю дегрануляцию тромбоцитов, стабилизированных с помощью 30-75 мкМ  $H_2O_2$ . По всей видимости, описанное в литературе

снижение тромбоцитарной агрегации под действием низких доз  $H_2O_2$  связано в первую очередь со снижением контактной способности тромбоцитов, потерей ими возможности образовывать тесные связи между большим числом клеток. Стабилизация тромбоцитов с помощью низких доз перекиси водорода представляется актуальной при изготовлении тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов, в частности, раневых повязок для использования в регенеративной и неотложной медицине.

#### **5.4 Стабилизация тромбоцитов человека с помощью аскорбиновой кислоты**

Аскорбиновая кислота (АсК) широко используется в качестве антиоксиданта при неотложных состояниях, сопровождающихся системной воспалительной реакцией. Инъекции АсК предотвращают закупорку капилляров путем ингибирования адгезии тромбоцитов на эндотелии, восстанавливают нормальный заряд мембран эндотелиальных клеток, нормализуют выработку оксида азота NO [14, 19]. Показано, что в норме тромбоцитарная АсК подавляет выработку в тромбоцитах эндогенной перекиси, снижает активность циклооксигеназы, в условиях оксидативного стресса АсК препятствует экспрессии на поверхности тромбоцитов про-воспалительного лиганда CD40, вызывающего гиперактивацию лейкоцитов и образование лейкоцит-тромбоцитных агрегатов [275]. Однако инъекционное введение АсК способно локально повышать ее концентрацию в крови с 50-80 мкМ (норма) до 1-5 мМ. Есть данные, что при таком уровне АсК агрегационная активность тромбоцитов заметно возрастает [210]. Однако при этом не проводилось детального исследования морфофункционального статуса тромбоцитов.

Проведенный нами 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 роста ламеллы. При 0,5 мМ АсК только у 10% адгезирующих клеток наблюдался интенсивный рост ламеллы, при

концентрации 1-2 мМ АсК – у 18-20%. В условиях 2-3 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 2 мМ АсК и на  $41,0 \pm 2,4\%$  при 3 мМ ( $p < 0,05$ ). При дальнейшей экспозиции с 2-3 мМ АсК тромбоциты продолжали дегранулироваться и полностью теряли гранулы через 30-40 мин. 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 условиях 0,1-1 мМ АсК многие адгезировавшие клетки располагались на стекле дискретно и не контактировали друг с другом, одновременно с этим часть гранул сохранялась в адгезирующих тромбоцитах (табл. 11). Наибольшая сохранность тромбоцитарных гранул отмечена в образцах, инкубированных с 0,5 мМ АсК, составляя 55%. Таким образом, в диапазоне концентраций АсК от 0,1 до 0,5 мМ отмечен дозозависимый эффект подавления роста ламеллы и дегрануляции в тромбоцитах, при 1 мМ АсК сохранность гранул в адгезирующих тромбоцитах была уже ниже, чем при 0,5 мМ АсК на фоне значительного подавления роста ламеллы. Концентрации 2 мМ АсК и выше вызывали спонтанную активацию тромбоцитов. Показано, что АсК заметно смещает редокс-потенциал среды в область выраженных отрицательных значений, которые, как было показано в предыдущей главе, способны стимулировать спонтанную активацию тромбоцитов. Так, в присутствии 3 мМ АсК расчетное значение редокс-потенциала плазмы составляет в среднем  $-250$  мВ [1,4], при котором в тромбоцитарных интегриновых белках происходит массовый переход  $-S-S-$  связей в  $-SH$  группы, что стимулирует адгезию и агрегацию тромбоцитов [9]. С другой стороны, при 0,2-0,5 мМ АсК наблюдается значительное снижение контактной активности тромбоцитов и их агрегации. По всей видимости, концентрации АсК 0,2-0,5 мМ вызывают нейтрализацию эндогенной перекиси, вырабатываемой в тромбоцитах в процессе их адгезии или агрегации, и таким образом блокируют развитие внутриклеточного сигнала активации. Поэтому

0,2-0,5 мМ аскорбиновой кислоты могут быть использованы для снижения рисков спонтанной активации тромбоцитов в суспензии, для оптимизации процедур подготовки тромбоцитов для задач клинической медицины. Можно предположить, что воздействие определенных концентраций АсК позволит заблокировать тромбоциты на ранних стадиях активации, в состоянии, когда тромбоциты уже адгезировали, но еще не выбросили гранулы. Такая стабилизация тромбоцитов и гранул в их составе имеет большое значение при создании биопрепаратов с цельными тромбоцитами, особенно при создании раневых покрытий.

Таблица 11 – Морфофункциональный анализ адгезии тромбоцитов, предварительно инкубированных с аскорбиновой кислотой в течение 30 мин

Концентрация АсК в БотП	Морфофункциональные параметры адгезирующих тромбоцитов через 1 час адгезии при 37°C			
	Доля клеток с ламеллой среди всех адгезировавших тромбоцитов, %	Доля клеток с гранулами среди адгезировавших тромбоцитов, %	МФАТ адгезировавших тромбоцитов, баллы	Сохранность гранул в адгезировавших тромбоцитах, %
Контроль (без АсК)	95,0±1,1	0,7±0,2*	25,6±1,2	0
0,1 мМ АсК	92,5±3,0	36,0±1,3*	33,1±1,7	15
0,2 мМ АсК	19,5±2,0*	42,5±2,2*	49,3±1,6*	39
0,5 мМ АсК	10,1±1,3*	65,1±3,2*	54,3±1,9*	55
1 мМ АсК	20,1±2,1*	60,0±3,8*	50,2±1,6*	48
2 мМ АсК	18,9±0,9*	0,9±0,3	25,9±1,7	0
5 мМ АсК	95,1±1,0	0,6±0,3	25,0±0,9	0
* p<0,05 относительно контроля (t-критерий Стьюдента)				

## ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО СОСТАВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

### **6.1 Анализ цитокинового состава тромбоцитных препаратов, приготовленных разными способами**

Тромбоциты человека обладают высокой чувствительностью и реактивностью, поэтому в процессе подготовки биологического материала к клиническому применению может происходить разрушение тромбоцитов, а также их дегрануляция [29, 38]. Выделенные тромбоцитами факторы являются весьма нестойкими соединениями и под воздействием внешних факторов способны быстро терять свою активность. Следовательно, до исследований *in vivo* необходима оценка качества препаратов на основе тромбоцитов, которая должна включать как морфофункциональные, так и биохимические характеристики. Целью данной работы было оценить цитокиновый состав (уровень репаративных факторов), тромбоцитарных лизатов полученных различными способами.

На начальном этапе проводили морфофункциональный анализ клеток исходной крови доноров, а также образцов БоТП, ЛейкБоТП, ОтмТр, БедПл, ПассПл, из которых впоследствии были получены лизаты. Предложенная двухэтапная процедура центрифугирования не вызывала значимого снижения качества тромбоцитов в готовой БоТП (табл. 11), при этом данный способ позволял получить высококонцентрированную суспензию тромбоцитов. 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 (табл. 12). В образцах, полученных путем пассивной седиментации, общая концентрация тромбоцитов была снижена в 2,3 раза по сравнению с БоТП, тогда как концентрация лейкоцитов, напротив, была повышена.

Таблица 12 – Сравнение тромбоцитных препаратов, полученных разными способами

Тип образца	Морфофункциональные параметры тромбоцитов (Me [25%; 75%])			
	Концентрация тромбоцитов, $10^9/\text{л}$	Концентрация лейкоцитов, $10^9/\text{л}$	Уровень тромбоцитов с гранулами, %	ААТ, баллы
Исходная кровь n=10	303 [290; 333]*	5,4 [5,1; 5,9]*	46 [40; 50]	45 [40; 48]
БоТП n=10	1668 [1147; 1679]	0,5 [0; 1,2]	45 [38; 50]	40 [30; 50]
ЛейкБоТП n=10	1773 [1263; 1882]	21 [11,2; 25,0]*	44 [38;49]	44 [38;48]
БедПл n=10	86 [69; 87]*	0 [0; 0]*	30 [30;40]*	30 [30;40]*
ОтмТр n=10	1431 [1358; 1602]	0 [0; 1,3]*	45 [40; 49]	38 [35; 48]
ПассПл n=10	714 [668; 719]*	5,9 [5,6; 8,2]*	44 [44; 50]	43 [40; 50]
*p<0,05 относительно БоТП (критерий Вилкоксона) n – число исследований				

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 ЛейкБоТП была значительно выше, чем в сыворотке (рис. 33). 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. Образцы ПассПл значимо не отличались от сыворотки по уровню IL1- $\alpha$ , IL 6 и VEGF, образцы ОтмТр имели сходный с сывороткой уровень IL1- $\alpha$ , IL 6 и TGF- $\alpha$  (рис. 33, 34). Концентрация всех остальных факторов в ПассПл и ОтмТр были достоверно выше, чем в сыворотке. В целом, можно заключить, что препараты с исходно высоким уровнем тромбоцитов (БоТП, ЛейкБоТП, ОтмТр) содержали гораздо больше ростовых факторов по сравнению с сывороткой. Таким образом, ростовые факторы более оправдано выделять, используя концентрированные тромбоцит-содержащие препараты, а не сыворотку крови.

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 9,1 раз соответственно ( $p < 0,05$ ). Концентрации FGF-2, IL 6, IL 8, TNF- $\alpha$  в БоТП и БедПл достоверно не различались, концентрация IL1- $\alpha$  в БедПл была в 2,8 раз выше, чем в БоТП. Это может быть связано с частичной дегрануляцией тромбоцитов в процессе двухэтапного центрифугирования и выходом части факторов из тромбоцитов в плазму еще до криодеструкции клеток. Особенно любопытно, что лизаты БедПл также имели более высокую концентрацию факторов VEGF и TGF- $\alpha$  по сравнению с БоТП. В среднем, уровень VEGF и TGF- $\alpha$  в БедПл превышал аналогичные значения для БоТП в 1,45 раз и 2,45 раз соответственно ( $p < 0,05$ ). С учетом того, что VEGF и TGF- $\alpha$  играют значительную роль в неоангиогенезе, можно предположить, что лизат БедПл может быть использован для стимуляции роста сосудов, наряду с БоТП. В образцах лизатов ЛейкБоТП был значительно увеличен уровень IL 6 и IL 8 по сравнению с БоТП. Одновременно была выявлена корреляционная зависимость между содержанием лейкоцитов в ЛейкБоТП и концентрацией IL8 в конечном лизате ( $r = 0,638$ ,  $p = 0,000$ ). Концентрация других про-воспалительных цитокинов – IL1- $\alpha$  и TNF- $\alpha$  – значимо не отличалась от аналогичных значений в БоТП (рис. 33). По мере увеличения общей концентрации лейкоцитов наблюдался рост концентрации PDGF ( $r = 0,383$ ,  $p = 0,005$ ) в ЛейкБоТП; общий уровень PDGF в лизатах ЛейкБоТП был в среднем в 1,9 раза выше, чем в лизатах БоТП.



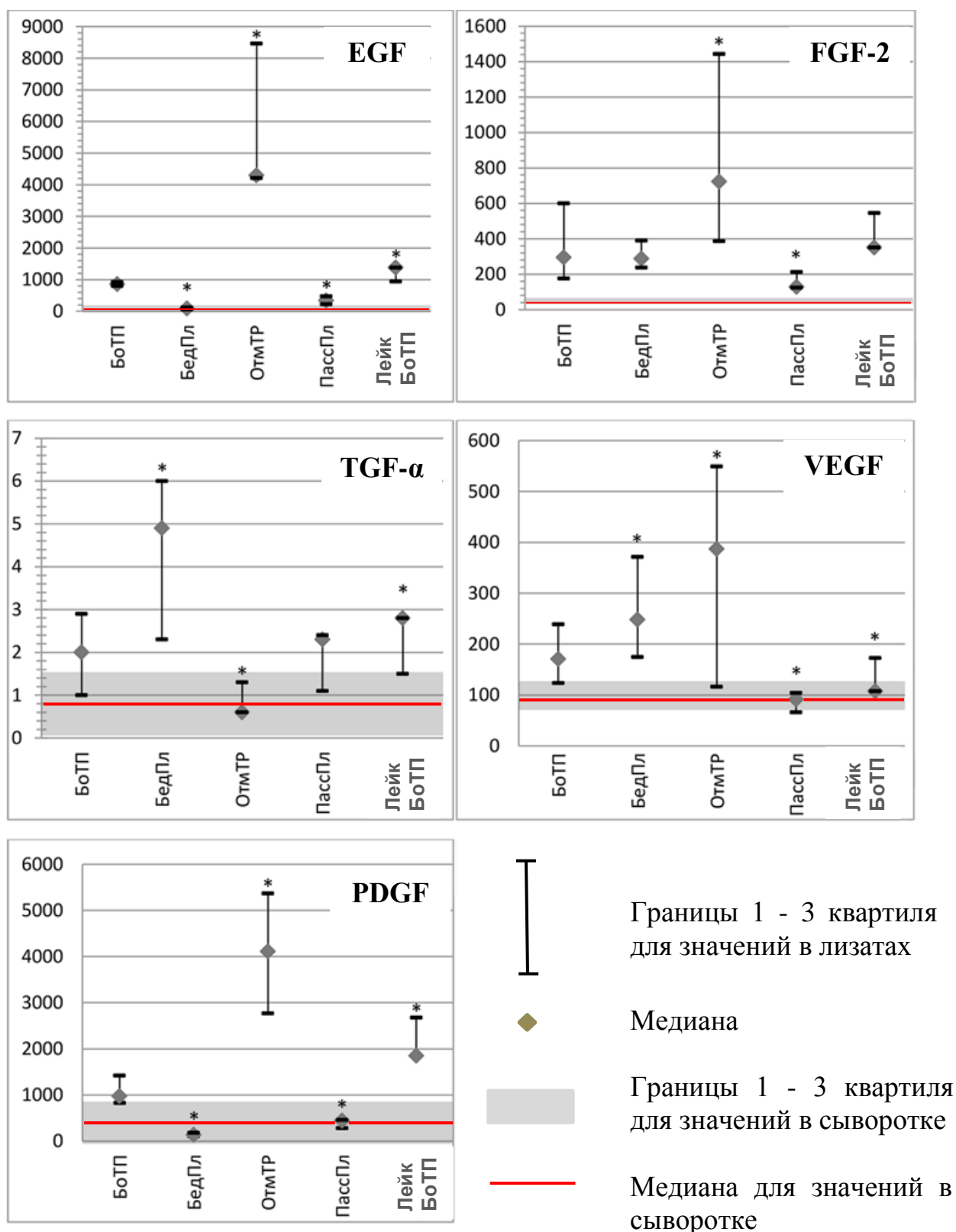


Рисунок 33 – Содержание факторов роста в сыворотке и лизатах тромбоцитных препаратов разных типов (в пг/мл).

\*- различия с BoTP достоверны (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ ).

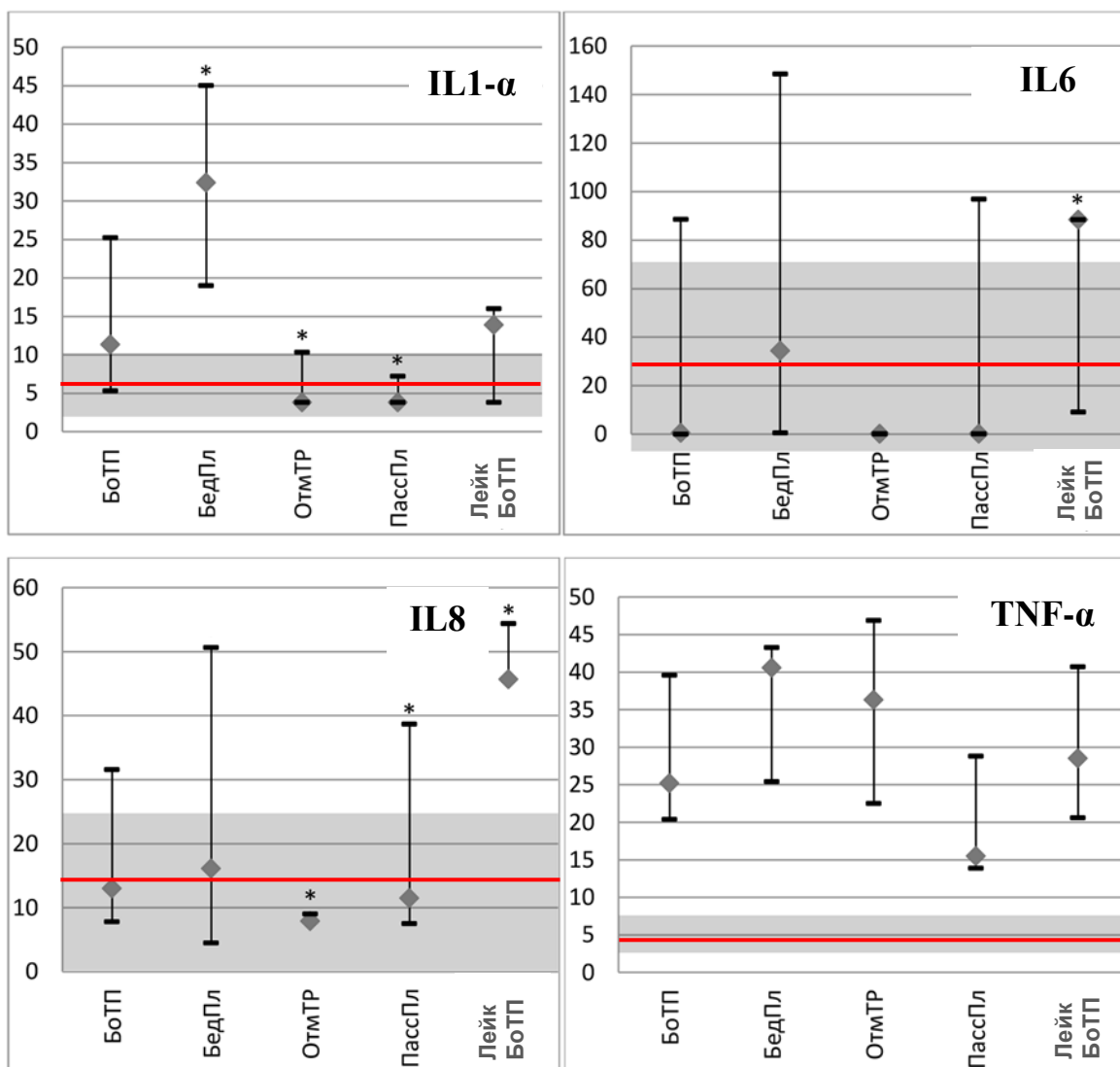


Рисунок 34 – Содержание про-воспалительных цитокинов в сыворотке и лизатах тромбоцитных препаратов разных типов (в пг/мл).

\* - различия с БоТП достоверны (критерий Краскела-Уоллиса,  $p < 0,05$ )

Особенно интересным является то, что в образцах ЛейкБоТП была снижена концентрация фактора роста эндотелия сосудов VEGF. Таким образом, наличие в БоТП большого числа лейкоцитов увеличивает содержание ростового фактора PDGF, про-воспалительных хемокинов IL6 и IL8 и заметно снижает содержание VEGF в конечном лизате. Это стоит учитывать при использовании тромбоцитных препаратов для стимуляции ангиогенеза.

В плазме, полученной путем пассивной седиментации (ПассПл), содержание всех ростовых факторов, за исключением TGF- $\alpha$ , было меньше, чем в БоТП. В первую очередь, это может быть обусловлено тем, что до криодеструкции клеток общее содержание тромбоцитов с гранулами в БоТП было достоверно выше (в среднем, в 2,2 раза) по сравнению с ПассПл. При этом уровень PDGF и EGF в конечных лизатах БоТП и ПассПл также различался в 2,2-2,3 раза. Это еще раз подтверждает наше наблюдение о том, что после двухэтапного центрифугирования основной объем PDGF и EGF остается в составе тромбоцитов с гранулами. Вместе с тем, лизаты ПассПл содержали очень небольшое количество VEGF и FGF-2 – концентрации этих факторов были достоверно ниже, чем в образцах БедПл ( $p < 0,05$ ), хотя общая концентрация тромбоцитов с гранулами в ПассПл изначально была выше в 11,9 раз по сравнению с БедПл (табл. 12). Как уже было отмечено, уровень VEGF в ПассПл не отличался от аналогичного параметра в сыворотке. При этом до криодеструкции образцы ПассПл содержали большое количество лейкоцитов, сопоставимое с тем, что было в исходной крови (табл. 11), которую также использовали для получения сыворотки. Влияние лейкоцитарного материала на ростовые факторы изучено недостаточно подробно и требует дальнейшего исследования.

В лизатах, где тромбоциты ресуспендировали в бесплазменной среде (ОтмТр), концентрация большинства ростовых факторов была заметно выше, чем в БоТП: PDGF – в 4,2 раза, FGF-2 – в 2,5 раз, EGF – в 4,9 раз, VEGF – в 2,3 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Одновременно с этим, концентрация IL1- $\alpha$  снижалась в 3 раза, IL 6 – в 1,6 раз ( $p < 0,05$ ). Таким образом, отмывание тромбоцитов от плазмы после двухэтапного центрифугирования позволило заметно увеличить содержание ростовых факторов и одновременно с этим частично снизить содержание про-воспалительных интерлейкинов в конечном тромбоцитарном лизате. В лизатах отмытых тромбоцитов концентрация факторов PDGF, FGF-2, EGF, VEGF была наибольшей среди всех обследованных

групп, что делает этот препарат наиболее перспективным для использования в регенеративной медицине.

Корреляционный анализ показал, что существует достоверная прямая связь концентраций PDGF и EGF как между собой ( $R=0,801$ ,  $p=0,000$ ), так и с количеством функционально полноценных тромбоцитов с гранулами (для EGF –  $r=0,696$ ,  $p=0,000$ , для PDGF –  $r=0,701$ ,  $p=0,001$ ). Таким образом, основным источником EGF и PDGF в крови являются функционально полноценные тромбоциты с гранулами. При этом концентрация EGF и PDGF в лизатах не коррелировала с общим количеством тромбоцитов в исходных образцах. Это указывает на то, что общая концентрация клеток в БотП не позволяет адекватно оценить репаративный потенциал препарата на основе тромбоцитов и необходимо проводить комплексный морфофункциональный анализ исходных тромбоцитов.

В процессе исследования лизатов выявлена сильная корреляционная зависимость между уровнем VEGF и TNF- $\alpha$  ( $r=0,757$ ,  $p=0,000$ ). Также была выявлена умеренная корреляционная зависимость между VEGF и FGF-2 ( $r=0,562$ ,  $p=0,000$ ), TGF- $\alpha$  и TNF- $\alpha$  ( $R=0,610$ ,  $p=0,0001$ ), TGF- $\alpha$  и VEGF ( $R=0,526$ ,  $p=0,0001$ ), TGF- $\alpha$  и IL1- $\alpha$  ( $R=0,689$ ,  $p=0,0001$ ), TGF- $\alpha$  и IL6 ( $R=0,629$ ,  $p=0,0001$ ). В отличие от фактора дифференцировки TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$  в большей степени является ростовым фактором, на 30% повторяет гомологию EGF и способен стимулировать рост эпидермальных клеток, наряду с EGF [180]. В то же время, какой либо связи между концентрацией TGF- $\alpha$  и EGF в лизатах выявить не удалось ( $R=-0,055$ ,  $p=0,605$ ). Наличие сильной корреляционной зависимости между факторами может указывать на их ко-локализацию, т.е. расположение в одних и тех же гранулах тромбоцитов. Отсутствие корреляции означает, что факторы расположены в разных гранулах и существуют потенциальная возможность их отдельного выделения, под действием разных способов активации тромбоцитов.

В настоящее время сыворотку крови человека продолжают использовать в качестве источника ростовых факторов как при работе с культурой диплоидных клеток, так и при изготовлении биопрепаратов для регенеративной медицины [45, 77]. Однако полученные в работе данные показывают, что препараты, полученные на основе высоконцентрированных суспензий тромбоцитов, содержат заметно больше факторов роста и дифференцировки по сравнению с сывороткой. Примечательно, что уровень многих ростовых факторов в БедПл также превышал аналогичные показатели в сыворотке, хотя общее число тромбоцитов в БедПл было заметно ниже, чем в крови, из которой была получена сыворотка. Таким образом, для получения секретлируемых тромбоцитами ростовых факторов представляется более оправданным использовать тромбоцит-содержащие препараты, а не сыворотку крови.

## **6.2 Сохранность рост-стимулирующих факторов в составе стабилизированных тромбоцитов, адгезирующих на коллагене**

В процессе исследования сравнивали уровень тромбоцитарных компонентов в лизате исходной БоТП, а также в надсадке БоТП с нативными и стабилизированными тромбоцитами. Сохранность тромбоцитарных факторов определяли по отношению концентрации фактора в надсадке стабилизированной БоТП к концентрации того же фактора в нативной БоТП и выражали в %. Для стабилизации тромбоциты предварительно инкубировали с наносеребром в концентрации 1,25, 2,5 и 5,0 мкМ. После адгезии тромбоцитов на коллагеновых повязках содержание ростовых факторов в надсадке БоТП значимо не отличалось от их содержания в лизате исходной БоТП (табл. 12). В опытных образцах снижение секреции факторов тромбоцитами при адгезии на коллагене зависело от концентрации наносеребра и типа фактора. Наибольшая сохранность VEGF и EGF отмечена при 1,25 мкМ наносеребра, FGF-2, TGF- $\alpha$ , PDGF – при 2,5-5,0 мкМ наносеребра (табл. 13). Между опытами с концентрацией наносеребра 2,5 и 5 мкМ не выявлено достоверных различий по уровню FGF-2, TGF- $\alpha$ , EGF и PDGF.

Таблица 13 – Оценка сохранности ростовых факторов при стабилизации тромбоцитов наночастицами серебра

Тип образца	Концентрация ростовых факторов в плазме, пг/мл Me[25%,75%]				
	VEGF	EGF	FGF-2	TGF- $\alpha$	PDGF
Лизат исходной БоТП (n=12)	142 [108; 241]	292 [218; 362]	320 [266;354]	14 [10; 16]	1263 [1080; 1680]
Надосадок исходной БоТП после адгезии тромбоцитов (n=12)	129 [110; 232]	300 [206;357]	306 [278;340]	13 [10;16]	1255 [1053; 1670]
Надосадок БоТП, стабилизированной 1,25 мкМ наносеребра (n=12)	44 [39; 46]*	146 [133;165]*	285 [245;325]	10 [8;12]*	910 [847; 984]
Надосадок БоТП, стабилизированной 2,5 мкМ наносеребра (n=12)	71 [55;89]* <sup>+</sup>	190 [174;207]* <sup>+</sup>	180 [161;203]* <sup>+</sup>	6 [5;8]* <sup>+</sup>	695 [668; 853]* <sup>+</sup>
Надосадок БоТП, стабилизированной 5 мкМ наносеребра (n=12)	112 [110;205] <sup>#</sup>	202 [174;223]*	178 [1161;211]*	7 [6;9]* <sup>+</sup>	720 [690; 910]*
* относительно лизата исходной БоТП при p<0,05 + - относительно опыта с 1,25 мкМ наносеребра при p<0,05 # - относительно опыта с 2,5 мкМ наносеребра при p<0,05 (критерий Вилкоксона)					

Для оценки сохранности факторов в составе самих коллагеновых повязок после разморозки повязки вымачивали в изотоническом растворе хлорида натрия и центрифугировали при 700 g, затем отбирали полученный надосадок. Однако непосредственно в коллагеновых повязках удалось выявить только EGF – его содержание составило 176 пг/мл в повязках без наносеребра и 237 пг/мл в опытах с 2,5 мкМ наносеребра, содержание других факторов в повязках было очень низким при xMAP-анализе. Это может быть обусловлено как разрушением факторов в бесплазменной среде, так и их фиксацией на коллагене.

Таким образом, в стабилизированных тромбоцитах факторы, стимулирующие рост фибробластоподобных клеток (FGF-2, PDGF, TGF- $\alpha$ ) лучше сохраняются при 2,5 мкМ наносеребра, факторы, стимулирующие рост

эпителиальных клеток (VEGF, EGF) – при 1,25 мкМ наносеребра. Следовательно, тромбоциты, стабилизированные 2,5 мкМ наносеребра, будут наиболее эффективными для стимуляции роста фибробластов и других мезенхимальных клеток человека, тогда как для стимуляции роста эпителия и ангиогенеза более эффективными могут быть тромбоциты, стабилизированные 1,25 мкМ наносеребра. Подробнее влияние стабилизированных тромбоцитов на клетки человека *in vitro* изложено в главе 8.

В целом, можно заключить, что стабилизация тромбоцитов с помощью 2,5-5 мкМ наносеребра позволяет сохранить значительный объем факторов роста и дифференцировки в составе адгезирующих тромбоцитов. Это создает возможность использовать тромбоциты человека для насыщения различных матриксов репаративными факторами. С учетом того, что тромбоциты способны адгезировать на многих биополимерах, как естественных, так и искусственных, предложенный нами способ стабилизации тромбоцитов может быть весьма актуален при создании раневых покрытий, биоконструкций, а также комбинированных биотрансплантатов, насыщенных диплоидными клетками человека.

### **6.3 Способ приготовления лизата тромбоцитов с высоким содержанием ростовых факторов**

В литературе весьма широко описаны методики выделения из тромбоцитов ростовых факторов путем криодеструкции клеток, а также известны способы их лиофилизации [177, 220, 223]. Многие методы требуют многократной заморозки и разморозки лизатов при 37°C [69, 87, 142, 186], что может приводить к потере биологически активных веществ в их составе. При криодеструкции из тромбоцитов выходит все содержимое тромбоцитарных гранул, а не только факторы роста. Гранулы тромбоцитов содержат большое количество веществ, обладающих протеолитической активностью (кислые фосфатазы, металлопротеазы, гликозидазы), которые в условиях плазмы крови могут вызывать быстрое расщепление факторов роста как при 37°C, так и при 20-22°C

[208]. Кроме того, значительная часть ростовых факторов может быть сорбирована молекулами альбумина [189]. Все это затрудняет получения тромбоцитарных лизатов со стабильным цитокиновым составом. К настоящему моменту не было описано методик, которые позволяли бы получить тромбоцитарный лизат с высоким содержанием факторов роста и низким содержанием провоспалительных факторов. Как было показано в предыдущей главе, еще до криодеструкции тромбоцитов часть гранул выходит из клеток в процессе центрифугирования БоТП, причем эти гранулы содержат большое число провоспалительных факторов, в то время как факторы роста большей частью остаются в тромбоцитах. Как было показано, после центрифугирования плазмы с ускорением 700-1000 g в образующемся супернатанте (плазма, бедная тромбоцитами, БедПл) наблюдаются довольно высокие концентрации провоспалительных цитокинов. При этом в лизатах, полученных из БоТП и БедПл, уровень TNF- $\alpha$  и интерлейкинов 1/6/8 значимо не различался ( $p > 0,05$ ). Следовательно, концентрация этих провоспалительных факторов в лизате определялась их содержанием в бесклеточной плазме, а не в составе тромбоцитов, подвергшихся криодеструкции. Это говорит о том, что есть возможность коррекции цитокинового состава тромбоцитарных лизатов путем оптимизации режимов центрифугирования.

В трансфузиологии в зависимости от режима ускорения центрифугирование принято подразделять на «мягкое» (от 150 до 500 g), используемое при получении плазмы с тромбоцитами из цельной крови, и «жесткое» (от 3000 до 8000 g), предназначенное для сепарации крови на эритроцитарную массу, лейкоцитарный слой и бесклеточную плазму [59, 63, 252]. После «мягкого» центрифугирования общая концентрация тромбоцитов в плазме обычно варьирует от 300 до  $800 \cdot 10^9$ /л, что может быть недостаточным и требует дополнительного концентрирования тромбоцитов. Установлено, что центрифугирование плазмы при 3000-4000 g позволяет полностью осадить весь объем тромбоцитов [95, 209]. Однако проведенный морфофункциональный анализ БоТП, центрифугированной при 2000-4000 g,



показал, что «жесткое» центрифугирование вызывало изменения в структуре тромбоцитов, в первую очередь, содержащих гранулы. Во многих тромбоцитах с гранулами выявлено выраженное смещение гранул к клеточной периферии, контакт с клеточной оболочкой и даже частичный выход за пределы клетки (рис. 35). После центрифугирования 2000-4000 g уровень Дтр.гр. снижался достоверно снижался – в среднем на  $23 \pm 1\%$  ( $p < 0,05$ ); тромбоциты в осадке были тесно ассоциированы друг с другом, их ресуспендирование было весьма затруднительным.

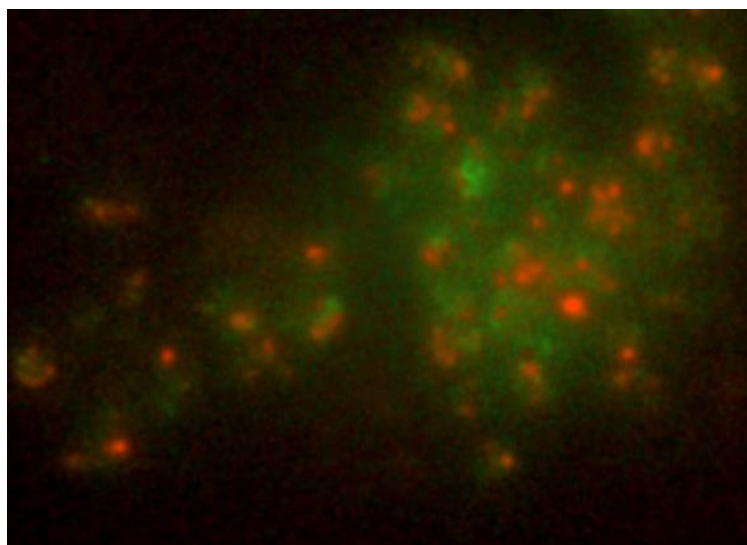


Рисунок 35 – Дегрануляция тромбоцитов после центрифугирования крови доноров с ускорением 3500 g. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение  $\times 1500$ .

Напротив, после центрифугирования крови с ускорением ниже 2000 g достоверного снижения качества тромбоцитов не наблюдалось (табл. 13). Проведенное исследование показало, что осаждение тромбоцитов на дно флакона наблюдается уже при ускорении 700-800 g, при этом в супернатанте остаются только биологически неполноценные клетки, лишённые гранул, и не происходит нарушения качества тромбоцитов в осадке. Двухэтапное центрифугирование при 300-500 g и 700-1000 g с последующим ресуспендированием осадка тромбоцитов плазмой позволяет получить БотП с общей концентрацией клеток от 1200 до  $1800 \cdot 10^9$ /л. После такого двухэтапного

центрифугирования значения морфофункциональных параметров тромбоцитов значимо не отличались от исходной крови, в готовой БоТП клетки имели нормальный уровень МФСТ (табл. 14). Таким образом, ускорение 700-1000 g позволяет осаждавать тромбоциты с гранулами без их массового повреждения или активации и может быть использовано для отмывания тромбоцитов от плазмы.

Таблица 14 – Влияние режимов центрифугирования на морфофункциональный статус тромбоцитов человека

Режим центрифугирования	Морфофункциональные параметры тромбоцитов доноров крови (n=10), Me [25%; 75%]		
	Дтр.гр., % (норма 35-75%)	МФАТ, баллы (норма 35-60 баллов)	ААТ, баллы (норма 30-75 баллов)
Исходная кровь	51 [47; 54]	48 [45; 51]	48 [45; 52]
300 – 500 g в течение 5-10 мин	50 [47; 54]	48 [45; 51]	48 [45; 51]
700-800 g в течение 10-20 мин	49 [46; 52]	47 [45; 50]	46 [44; 50]
1000 g в течение 5-10 мин	49 [47; 53]	47 [46; 50]	46 [44; 50]
2000 g в течение 5-10 мин	39 [36; 42]*	37 [35; 38]*	36 [35; 37]*
300-500 g в течение 5-10 мин, отбор плазмы с тромбоцитами и центрифугирование плазмы при 700 g в течение 15-20 мин	48 [45; 51]	46 [44; 50]	46 [44; 50]
300 g в течение 5-10 мин, отбор плазмы с тромбоцитами и центрифугирование плазмы при 1000 g в течение 5-10 мин	49 [46; 52]	47 [45; 50]	46 [44; 50]

\*Достоверно относительно исходной крови при  $p < 0,05$  (критерий Вилкоксона)

На следующем этапе оценивали содержание факторов роста и дифференцировки в тромбоцитах, отмытых от плазмы (ОтмТр). Образцы крови доноров-добровольцев центрифугировали при 300-500 g, отбирали аликвоты плазмы с тромбоцитами и центрифугировали при 700-1000 g с целью осаждения тромбоцитов, затем удаляли весь надосажок и ресуспендировали тромбоциты фосфатно-солевым раствором PBS (pH=7,3) или изотоническим 0,9% раствором хлоридом натрия. Объем среды, вносимой для ресуспендирования, был равен объему плазмы, используемой для получения БоТП. В полученных аликвотах ОтмТр общая концентрация тромбоцитов и их качество были сопоставимы с тем, что наблюдалось в БоТП (табл. 15).

Таблица 15 – Оценка качества клеток в тромбоцитных концентратах до и после отмывания от плазмы (до этапа заморозки)

Тип образца	Морфофункциональные параметры тромбоцитов Me [25%; 75%]			
	Общая концентрация тромбоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	Концентрация лейкоцитов, 10 <sup>9</sup> /л	Дтр.гр., %	ААТ, баллы
БоТП (n=20)	1480 [1415; 1525]	1,0 [0,7; 1,1]	50 [45; 55]	45 [43; 50]
Тромбоциты, отмытые от плазмы (n=20)	1436 [1389; 1503]	1,0 [0,5; 1,1]	50 [45; 53]	45 [43; 49]

\*Достоверно относительно БоТП при p<0,05 (критерий Вилкоксона)  
n – число исследований

Большое значение имеет эффективное ресуспендирование осадка тромбоцитов. Микроскопический анализ показал, что при осаждении тромбоциты формируют очень тесные конгломераты, которые часто не распадаются при простом взбалтывании пробы. Такие структуры обычно имеют вид хлопьев и могут достигать диаметра 1000 мкм. Пребывание в составе конгломератов само по себе не влияет на морфофункциональные свойства тромбоцитов, с другой стороны, тесный контакт тромбоцитов увеличивает риск

их спонтанной активации и дегрануляции, что приводит к снижению качества клеток и потере ими секреторных гранул. В частности, заготовка пулированных тромбоцитных концентратов, в процессе которой формируется очень большой осадок тромбоцитов, приводит к тому, что конечный продукт имеет более низкое качество клеток по сравнению с аферезным тромбоцитным концентратом или плазмой, выделенной из крови при 300-500 g [40]. Тромбоцитарные конгломераты удерживают остаточную плазму и могут препятствовать адекватному выходу ростовых факторов в процесс криодеструкции тромбоцитов. Таким образом, для исследования тромбоцитов в бесплазменной среде, а также для получения лизата необходимо максимально снизить уровень тромбоцитарных конгломератов в бесплазменной суспензии. Система взбалтывания суспензии клеток Vortex и горизонтальные шейкеры для перемешивания крови и ее компонентов не являются эффективными для ресуспендирования тромбоцитов в бесплазменной среде. Для ресуспендирования отмытых тромбоцитов необходимо использовать автоматические или механические пипетки со съемным пластиковым наконечником на 5-1000 мкл до полного исчезновения в пробе визуально различимых конгломератов тромбоцитов. Перед заморозкой суспензии тромбоцитов желательно добиться полного исчезновения тромбоцитарных конгломератов.

Тромбоцитарный лизат получали путем криодеструкции тромбоцитов при  $-40 / -80^{\circ}\text{C}$ , общее время хранения лизатов при  $-40 - -80^{\circ}\text{C}$  составляло 5-14 суток. Размораживание лизата проводили при температуре от  $+2$  до  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 10-12 часов (медленная разморозка). После разморозки образцы тромбоцитарных лизатов центрифугировали при 3000-4000 g в течение 10-20 мин для удаления всех клеточных фрагментов из конечного препарата. Содержание цитокинов оценивали с помощью мультиплексного анализа на платформе Luminex 200 (технология xMAP). В лизате БотП концентрация исследуемых цитокинов варьировалась в широком диапазоне значений. После отмывания тромбоцитов от плазмы регистрируемая концентрация PDGF в конечном лизате ОтмТр была

увеличена в 3,2 раза, FGF-2 – в 1,2 раза, EGF – в 6,1 раза соответственно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с БоТП (табл. 16). Одновременно с этим в лизатах ОтмТр значительно снижалось содержание провоспалительных интерлейкинов – уровень IL1- $\alpha$  был снижен в 3 раза, IL 6 – в 457 раз, IL 8 – в 1,5 раза по сравнению с лизатами исходной БоТП ( $p < 0,05$ ). Уровень фактора TNF- $\alpha$  значимо не различался между БоТП и ОтмТр. Таким образом, отмывание тромбоцитов от плазмы позволило заметно увеличить содержание ростовых факторов и одновременно с этим снизить содержание провоспалительных интерлейкинов в конечном тромбоцитарном лизате.

Таблица 16 – Содержание секретируемых тромбоцитами факторов в тромбоцитных лизатах до и после отмывания тромбоцитов от плазмы

Тип лизата	Концентрация тромбоцитарных цитокинов, пг/мл Me [25%; 75%]						
	PDGF	FGF-2	EGF	TNF- $\alpha$	IL1- $\alpha$	IL6	IL8
Лизат, полученный из БоТП n=18	1303 [918; 2591]	582 [316; 825]	695 [424; 929]	39,0 [23,0; 78,5]	11,4 [5,3; 26,2]	18,3 [3,3; 54,4]	12,0 [7,2; 21,7]
Лизат, полученный из отмывтых от плазмы тромбоцитов n=18	4110 [2769; 5369] *	724 [387; 1443] *	4297 [4213; 8465] *	36,3 [22,5; 46,9]	3,8 [3,8; 10,3] *	0,04 [0,01; 0,06] *	7,9 [7,8; 9,0] *
* Достоверно относительно БоТП при $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона) n – число исследований							

Оценку рост-стимулирующего эффекта проводили на примере культуры фибробластов человека линии М-22. Лизаты БоТП и ОтмТр объемом 10-50 мкл вызывали стимуляцию роста клеток в 1,2-1,5 раза без нарушения их структурной целостности (табл. 17, рис. 36А,Б,Г). При использовании 50 мкл лизата БоТП отмечено незначительное снижение ЦКМ, при этом общее количество клеток достоверно не отличалось от контроля (табл. 17, рис. 36В). Напротив, в опытах с

50 мкл ОтмТр рост-стимулирующий эффект сохранялся и сопоставим с тем, что наблюдался 20 мкл, снижение ЦКМ не происходило (рис. 36Д). В присутствии 100-500 мкл БоТП в культуре М-22 отмечено дозозависимое подавление роста клеток, а также заметное нарушение их структурной целостности. При 200-500 мкл БоТП практически все клетки в культуре имели измененную морфологию, не содержали секреторных везикул. Напротив, при использовании 100-500 мкл ОтмТр, рост-стимулирующий эффект сохранялся, как и при 10-50 мкл, выраженных структурных и функциональных изменений в клетках отмечено не было.

Таблица 17 – Морфофункциональный анализ фибробластов линии М-22 через 3 суток культивирования в присутствии лизата тромбоцитов

Контроль (без лизата)	Плотность клеток = $15,0 \pm 0,4$ тыс/см <sup>2</sup> ЦКМ = $35,2 \pm 1,5$ баллов			
	Лизат БоТП (М $\pm\sigma$ )		Лизат ОтмТр (М $\pm\sigma$ )	
Объем лизата тромбоцитов, внесенный в культуру М-22	Плотность клеток, тыс/см <sup>2</sup>	ЦКМ, баллы	Плотность клеток, тыс/см <sup>2</sup>	ЦКМ, баллы
10 мкл (n=30)	18,0 $\pm$ 0,2*	35,3 $\pm$ 1,2	18,8 $\pm$ 0,2*	35,0 $\pm$ 1,2
20 мкл (n=30)	21,2 $\pm$ 0,4*	35,0 $\pm$ 1,0	20,7 $\pm$ 0,4*	35,0 $\pm$ 1,3
50 мкл (n=30)	15,0 $\pm$ 0,3	33,1* $\pm$ 1,3	20,0 $\pm$ 0,3*	34,9 $\pm$ 1,5
100 мкл (n=30)	10,8 $\pm$ 0,5*	31,0* $\pm$ 1,3	19,5 $\pm$ 0,2*	34,5 $\pm$ 1,4
200 мкл (n=30)	6,0 $\pm$ 0,4*	29,0 $\pm$ 1,1*	22,0 $\pm$ 0,3*	35,0 $\pm$ 1,0
500 мкл (n=30)	2,9 $\pm$ 0,2*	27,3 $\pm$ 1,0*	21,7 $\pm$ 0,3*	34,7 $\pm$ 1,0
*Достоверно относительно контроля при $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента) n - число исследований				

Таким образом, предложенный способ приготовления бесплазменных тромбоцитарных лизатов позволяет получать препараты с высоким уровнем ростовых факторов и обладающие рост-стимулирующим эффектом.

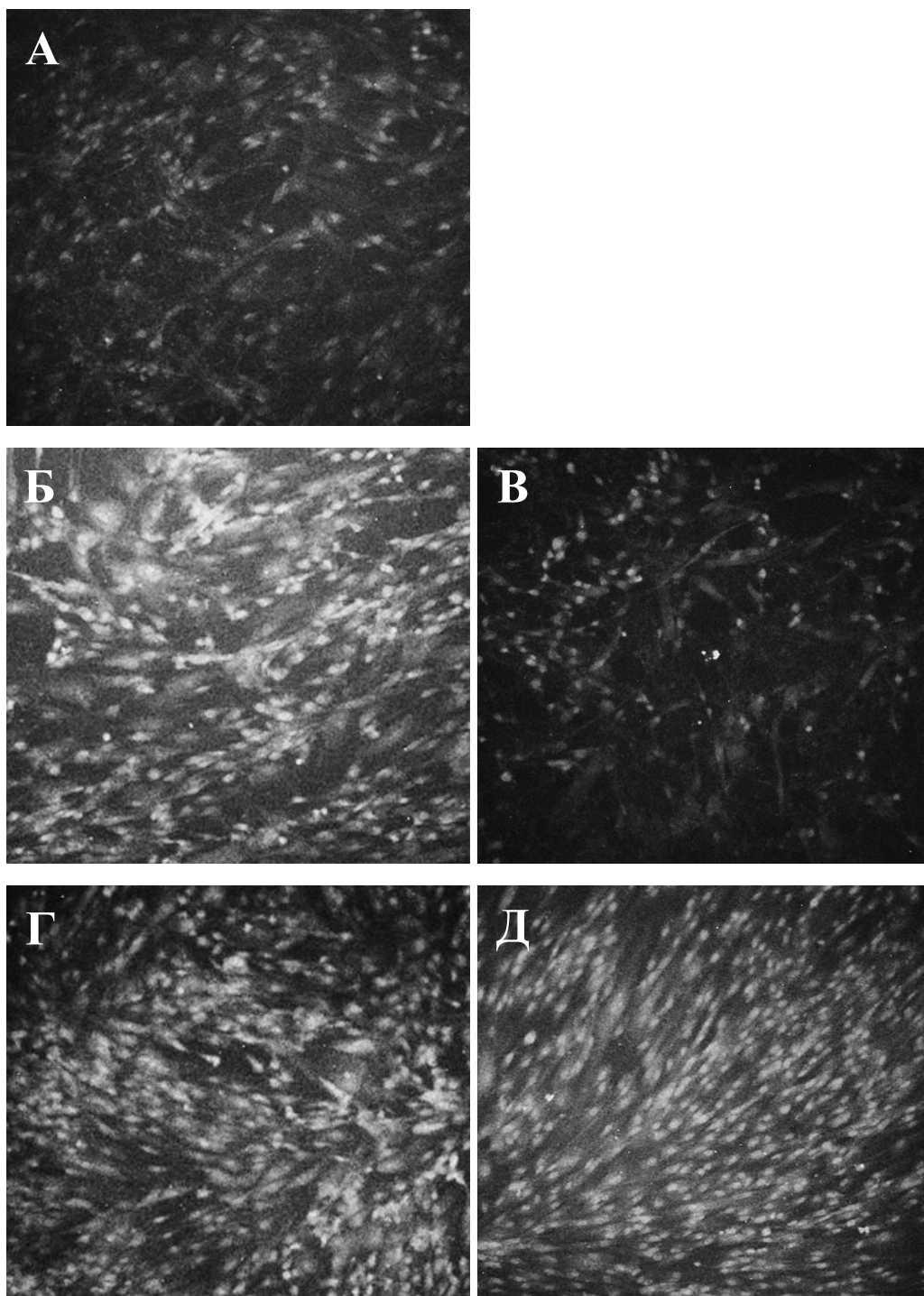


Рисунок 36 – Пролиферативная активность фибробластов человека линии М-22 через 3 суток культивирования в присутствии разных доз лизата БоТП и ОтмГр. Окраска трипафлавином-родамином С. Увеличение x100.  
А – культура без лизата (контроль); Б – 20 мкл лизата БоТП; В – 50 мкл лизата БоТП; Г – 20 мкл лизата ОтмГр; Д – 50 мкл лизата ОтмГр.

## ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ТРОМБОФИБРИНОВОГО СГУСТКА С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ

### **7.1 Получение тромбофибринового сгустка с ростовыми факторами из неконсервированной крови**

В практике ЛПУ зачастую доступен только самый простой инструментарий и отсутствует возможность асептического выделения БотП в стерильных условиях. В этих случаях весьма востребованы методики получения тромбоцитарных препаратов из неконсервированной крови. Чаще всего из неконсервированной крови получают тромбоцитарный гель, из которого затем выделяют тромбофибриновый сгусток. Показано, что центрифугирование неконсервированной крови с ускорением 100-500 g позволяет получать сгустки без примеси лейкоцитов и эритроцитов [261]. С другой стороны, использование неконсервированной крови заметно сокращает время необходимых манипуляций, не позволяет оценить качество исходных тромбоцитов и рассчитать их оптимальную дозу. Кроме того, образование ТФ непосредственно из неконсервированной крови сопровождается быстрой дегрануляцией тромбоцитов, что увеличивает риск потери тромбоцитарных компонентов. Поэтому для получения ТФ из неконсервированной крови оправдано использовать методики, увеличивающие время полимеризации фибрина *in vitro*.

Известно, что гипотермия позволяет существенно увеличить время свертывания крови без использования антикоагулянтов. При температуре ниже 20°C замедляется полимеризация фибрина, образование фибриновых сетей, а также частично блокируется контакт тромбоцитов с фибрином [193]. Однако неоднократно показано, что воздействие гипотермии в диапазоне +2 – +4°C до на тромбоциты очень часто вызывает их спонтанную активацию с выбросом гранул [266]. Поэтому необходимо было подобрать адекватную температуру,



при которой сохранность гранул в тромбоцитах без антикоагулянта будет максимально пролонгирована.

Кровь доноров сразу после забора помещали в центрифугу с внутренней температурой от 4°C до 16°C, неконсервированную кровь центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, выделяли плазму с тромбоцитами и проводили их морфофункциональный анализ. Полученные образцы плазмы экспонировали при температуре от 4°C до 16°C в течение 60 мин, после чего повторно исследовали качество тромбоцитов. В отсутствие антикоагулянта ТФ формировался в течение 15-20 мин при комнатной температуре (20-22°C), при 37°C этот процесс был значительно ускорен.

В условиях 4-16°C образование ТФ в плазме не наблюдалось в течение 1 часа и более. Морфофункциональный анализ показал, что в процессе выделения БоТП из неконсервированной крови при 8-12°C значительная часть тромбоцитов (свыше 70%) сохраняет гранулы в своем составе (табл. 18). Наиболее эффективными был диапазон от 10°C до 12°C, где сохранялось свыше 80% тромбоцитов с гранулами. При других температурах сохранность гранул была гораздо ниже. Во всех пробах можно было наблюдать мелкие тромбоцитарные конгломераты и агрегаты, однако при температуре от 8°C до 12°C клетки в составе таких агрегатов сохраняли большую часть гранул и не снижали яркости свечения при витальном окрашивании. Этот же эффект наблюдался и после 1 часа экспозиции БоТП в отсутствие антикоагулянтов. В течение 60 мин экспозиции БоТП при 4-16°C во всех опытах наблюдалось достоверное снижения уровня тромбоцитов с гранулами. Вместе с тем, при 10-12°C сохранность тромбоцитов с гранулами в БоТП была выше 60%, тогда как при 8°C этот параметр составил 44%, при других температурах – менее 30%. Таким образом, выделение и хранение плазмы с тромбоцитами из неконсервированной крови наиболее оптимально проводить при температуре 10-12°C.

Таблица 18 – Сохранность тромбоцитов с гранулами в ходе получения БоТП из неконсервированной крови при низкوپоложительных температурах

Тип образца	Содержание тромбоцитов с гранулами, % Me [25%; 75%]	Сохранность тромбоцитов с гранулами относительно их исходного уровня в крови, %
Исходная кровь (n=12)	48 [44;54]	-
БоТП непосредственно после выделения из неконсервированной крови		
БоТП при +4°C (n=12)	18 [17;20]	37,5
БоТП при +8°C (n=12)	31 [29;34]*	64,6
БоТП при +10°C (n=12)	39 [35;43]*#	81,2
БоТП при +12°C (n=12)	42 [38;44]*#	87,5
БоТП при +14°C (n=12)	19 [17;22]	39,6
БоТП при +16°C (n=12)	20 [16;21]	41,6
БоТП после выделения из неконсервированной крови и 60 мин хранения при разной температуре		
Выделение и хранение БоТП при +4°C (n=12)	6 [4;7]	12,5
Выделение и хранение БоТП при +8°C (n=12)	17 [15;20]*	35,4
Выделение и хранение БоТП при +10°C (n=12)	28 [26;31]*#	58,3
Выделение и хранение БоТП при +12°C (n=12)	32 [29;32]* #	66,7
Выделение и хранение БоТП при +14°C (n=12)	8 [5;10]	16,7
Выделение и хранение БоТП при +16°C (n=12)	5 [3;7]	10,4
*p<0,05 относительно БоТП при +4°C (критерий Вилкоксона) # p<0,05 относительно БоТП при +8°C (критерий Вилкоксона) n - число исследований		

Для получения ТФ образцы БоТП экспонировали при комнатной температуре (20-22°C) до формирования геля или сгустка с сывороткой. Время образования геля во всех случаях составляло 15-20 мин. Оценку рост-стимулирующего действия тромбофибриновых сгустков ММСК. Было установлено, что ТФ из неконсервированной крови, полученный стандартным способом при комнатной температуре, *in vitro* увеличивал рост клеток лишь в 1,1 раза, отличие от контроля было недостоверным (табл. 19). В то же время, ТФ, полученные с использованием предложенной методики, увеличивали пролиферативную активность диплоидных клеток человека в 1,2-1,4 раз ( $p < 0,05$ ) без видимого нарушения жизнеспособности клеток (табл. 19).

Таблица 19 – Оценка рост-стимулирующего эффекта тромбофибриновых сгустков в культуре клеток ММСК

Параметры оценки культуры ММСК	Способ получения ТФ					
	Контроль (Без ТФ) n=30		Выделение БоТП при 20-22°C n=30		Выделение БоТП при 10-12°C n=30	
	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток
Целостность клеточных мембран, баллы (M±σ)	33,0±1,0	32,8±1,1	33,0±1,0	32,2±1,1	33,0±1,0	32,8±1,0
Количество клеток в культуре, тыс/см <sup>2</sup> (M±σ)	8,0±0,5	15,0±1,4	8,0±0,9	15,9±1,9	8,0±0,5	19,2±0,7*

\*Достоверно относительно контроля при  $p < 0,05$  (t-критерий Стьюдента)  
n - число наблюдений

Таким образом, немедленное охлаждение *in vitro* неконсервированной крови до 8-12°C и последующее поддержание указанного температурного диапазона в течение 60 минут существенно снижает активность факторов свертывающей системы крови и сохраняет значимую долю тромбоцитов с гранулами. Это позволяет транспортировать биоматериал от места забора до центрифуги и выделять из него богатую тромбоцитами плазму без использования антикоагулянтов. В свою очередь использование богатой

тромбоцитами плазмы для получения тромбофибринового сгустка обеспечивает не только возможность равномерно распределить клетки в трансплантате, но и более выраженные рост-стимулирующие свойства. При этом самостоятельная трансформация БоТП в тромбоцитарный гель по мере нагрева до температуры окружающей среды позволяет отказаться от использования активаторов свертывания и получать трансплантат непосредственно *in situ*.

## **7.2 Получение тромбофибринового сгустка, насыщенного факторами роста**

В настоящее время в регенеративной медицине все активней используют препараты на основе тромбоцитарного геля и выделенного из него тромбофибринового сгустка (ТФ). Методики получения тромбоцитарного геля из аутологичной БоТП являются простыми и широкодоступными [50, 51]. Однако во всех известных методиках тромбоцитарный гель получают в условиях 37°C, когда происходит очень быстрая дегрануляция тромбоцитов. При такой активации основная часть тромбоцитарных компонентов выходит в раствор, который очень легко отделяется от геля в процессе ретракции тромбофибринового сгустка [89]. В ряде случаев удается использовать тромбоцитарный гель еще до полной ретракции ТФ, однако в любом случае основная часть ростовых факторов оказывается вне ТФ и подвержена быстрому разрушению. Это не позволяет получить ТФ с высокими рост-стимулирующими свойствами. Поэтому целью работы было разработать такую методику получения тромбоцитарного геля, чтобы активация и агрегация тромбоцитов проходила без полной их дегрануляции в процессе полимеризации фибрина и образования геля.

На первом этапе решения поставленной задачи был осуществлен подбор оптимального индуктора активации тромбоцитов для получения тромбоцитарного геля. Способность к активации имеют только биологически полноценные тромбоциты (клетки с гранулами). В физиологических условиях (37°C) воздействие стандартных/канонических индукторов активации (коллаген,

АДФ, тромбин и др.) вызывает быстрый и необратимый выброс гранул за пределы тромбоцита [89, 208], также тотальная дегрануляция тромбоцитов происходит при внесении в плазму хлорида кальция (стандартный способ получения тромбоцитарного геля). В предыдущих главах показано, что *in vitro* тромбоциты человека могут быть активированы даже при 20-22°C, при этом интенсивная агрегация не всегда сопровождается быстрым выбросом гранул. Однако при помещении таких образцов в термостат с 37°C процесс выброса гранул тромбоцитами заметно ускоряется. Таким образом, для замедления дегрануляции тромбоцитов стоит избегать физиологических температур и активировать тромбоциты при более низких температурах. С другой стороны, неканонические факторы активации тромбоцитов могут замедлять или нарушать полимеризацию фибрина. Было необходимо подобрать индуктор активации, позволяющий получать тромбоцитарный гель в условиях 20-22°C.

Среди известных препаратов, потенциально способных активировать тромбоциты, был выбран препарат для инъекций «Адреналина гидрохлорид-Виал». В состав препарата входит эпинефрин (адреналин) в концентрации 1мг/мл, дисульфит натрия, хлорид натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), хлористоводородная кислота, вода для инъекций. Адреналин вызывает активацию тромбоцитов *in vivo* и *in vitro* путем воздействия на специфические адреналин-зависимые рецепторы [55,73]. Дисульфит натрия и хлористоводородная кислота обладают выраженными восстановительными (электрон-донорскими) свойствами, что также может способствовать активации тромбоцитов. В среде с высоким восстановительным редокс-потенциалом происходит активация рецепторов на поверхности тромбоцитарных мембран, которые запускают каскад внутриклеточных сигналов и в результате стимулируют адгезию и агрегацию тромбоцитов [111]. Таким образом, препарат «Адреналина гидрохлорид-Виал» потенциально способен запускать активацию тромбоцитов разными путями, причем совмещение этих путей может оказывать синергетический эффект и усиливать образование тромбоцитарного геля.

Для оценки эффективности данного препарата был проведен ряд экспериментов. В работе использовали БоТП, выделенную из крови доноров при 300-400 g, а также БоТП, полученную путем двухэтапного центрифугирования. После добавления препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» в БоТП при концентрациях адреналина ниже 1 мМ при 20-22°C выраженной активации тромбоцитов не происходило, при 37°C формировались многочисленные тромбоцитарные агрегаты, одновременно с этим наблюдалась дегрануляция большинства биологически полноценных тромбоцитов (рис. 37а). Стоит особо отметить, что при концентрациях адреналина 1 мМ формирование агрегатов в условиях 37°C не сопровождалось тотальной активацией тромбоцитов, часть клеток с гранулами оставалась неактивированной (табл. 19). При использовании 1 мМ адреналина препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» при 22°C через 5 минут в БоТП формировались многочисленные агрегаты диаметром до 20 мкм, при этом подавляющее число клеток в таких агрегатах сохраняли гранулы в своем составе (рис. 37б). При дальнейшей экспозиции гранулы постепенно выходили из тромбоцитов, однако тромбоцитарный гель при этом не образовывался. В опытах, где БоТП была получена из крови путем однократного центрифугирования при 300-400 g, внесение препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» вместе с 30-40 мМ хлорида кальция во всех случаях к образованию тромбоцитарного геля при 22°C (табл. 20). Стоит особо подчеркнуть, что на начальных стадиях образования геля в БоТП можно было видеть одиночные фибриновые нити, к которым прикреплены многочисленные мелкие агрегаты тромбоцитов, которые содержат гранулы (рис. 38). Гранулы также можно было выявить уже в готовом геле (рис. 39). В опытах, где БоТП была получена в результате двухэтапного центрифугирования (300 g и 700 g), тромбоциты массово агрегировали при 20-22°C, но при этом время полимеризации фибрина было гораздо выше (в 1,5-3 раза). Это может быть обусловлено действием находящихся в плазме тромбоцитарных компонентов на систему плазменного гемостаза.

Таблица 20 – Активация тромбоцитов БоТП с помощью адреналин-содержащих препаратов при 37°C и 22°C

Конечная концентрация индукторов активации в БоТП		Содержание тромбоцитов с гранулами через 30 мин экспозиции, Ме [25%;75%]		Степень активации тромбоцитов	Формирование геля
		%	тыс/мкл		
БоТП до активации (n=15)		50 [48;54]	197 [182;227]	-	-
0,5 мМ адреналина (раствор для лабораторных исследований) n=15	22°C	50 [48;54]	197 [180;227]	Морфология тромбоцитов и локализации в них гранул не изменяется по сравнению с исходной пробой	Нет
	37°C	47 [45;53]	178 [168;216]	Выявляются мелкие (до 20 мкм) агрегаты, однако подавляющее большинство клеток в их составе содержит гранулы.	Нет
1 мМ адреналина (раствор для лабораторных исследований) n=15	22°C	50 [48;54]	196 [180;225]	В тромбоцитах с гранулами наблюдается смещение гранул к периферии цитоплазмы.	Нет
	37°C	18 [16;19] *	72 [68; 79]*	Образуются многочисленные мелкие (до 20 мкм) агрегаты тромбоцитов с гранулами. Вне агрегатов тромбоциты с гранулами не выявляются.	Нет
30 – 40 мМ хлорида кальция n=15	22°C	50 [48;54]	190 [180;225]	Тромбоциты не активируются, тромбофибриновый сгусток не формируется	Нет
	37°C	0*	0*	Наблюдается полная активация и дегрануляция всех тромбоцитов с гранулами; агрегаты тесно связаны с фибриновым сгустком.	Да
1 мМ адреналина (препарат «Адреналина гидрохлорид Виал») n=15	22°C	20 [18;24] *	82 [56;106]*	Через 15 мин после внесения индукторов формируются агрегаты до 20 мкм, через 30 мин начинается формирование тромбоцитарного геля	Да
1 мМ адреналина (препарат «Адреналина гидрохлорид Виал») + 35 мМ хлорида кальция n=15	22°C	0*	0*	Через 10 мин после внесения индукторов формируются крупные агрегаты (свыше 100 мкм), через 20-30 мин тромбоцитарный гель полностью сформирован	Да
*Достоверно относительно контроля при p<0,05 (критерий Вилкоксона)					
n – число исследований					

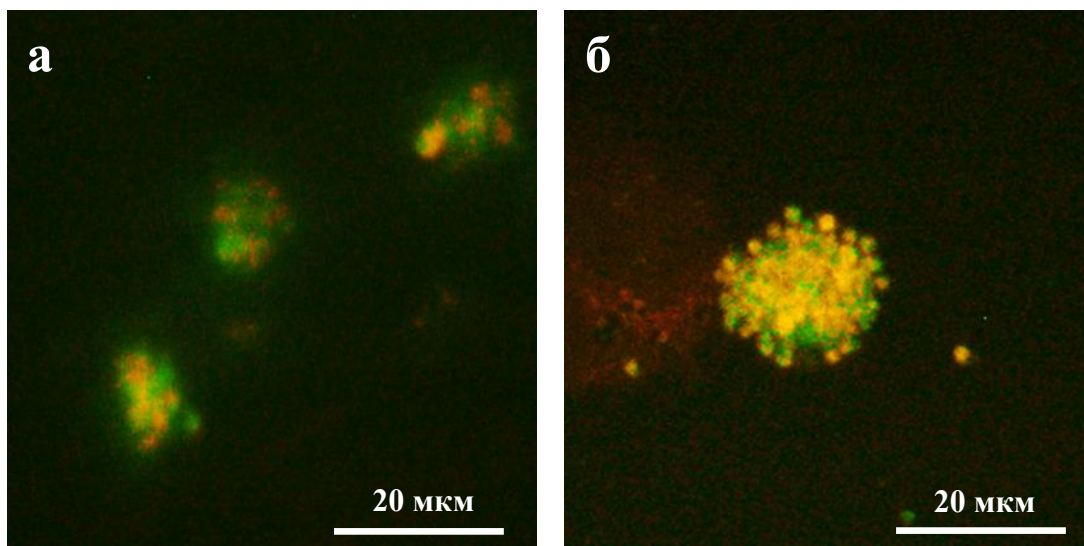


Рисунок 37 – Активация тромбоцитов с помощью адреналина. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым.

а – 1 мМ адреналина (раствор адреналина для оптической агрегометрии).  
Инкубация 5 мин при 37°С.

б – 1 мМ адреналина (препарат «Адреналина гидрохлорид Виал»). Инкубация  
5 мин при 20-22°С.

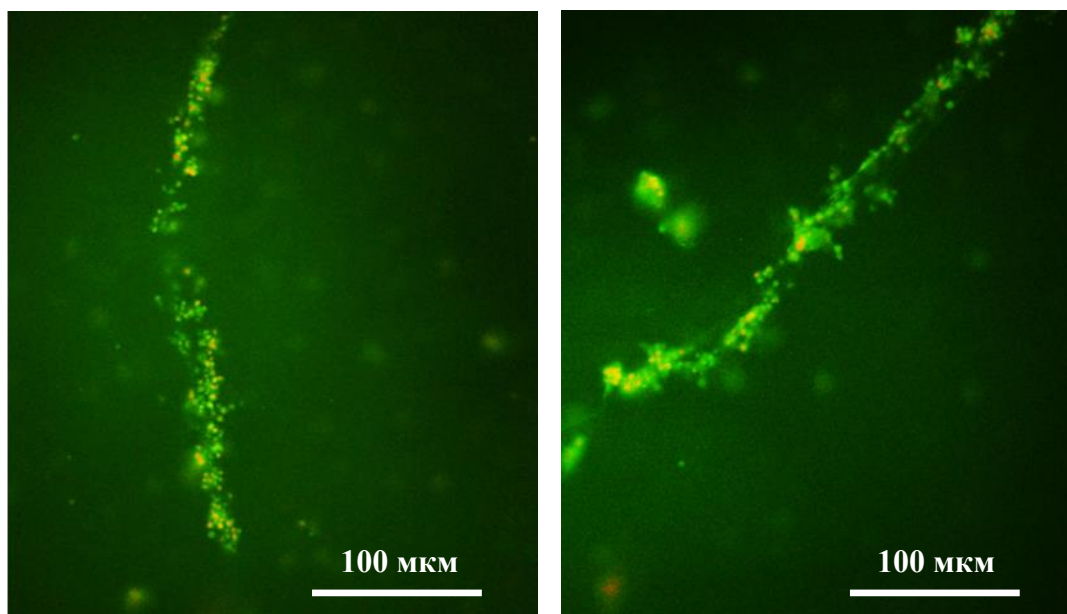


Рисунок 38 – Образование тромбоцит-ассоциированных фибриновых нитей под действием препарата «Адреналина гидрохлорид Виал» и хлорида кальция при 22°С. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым.



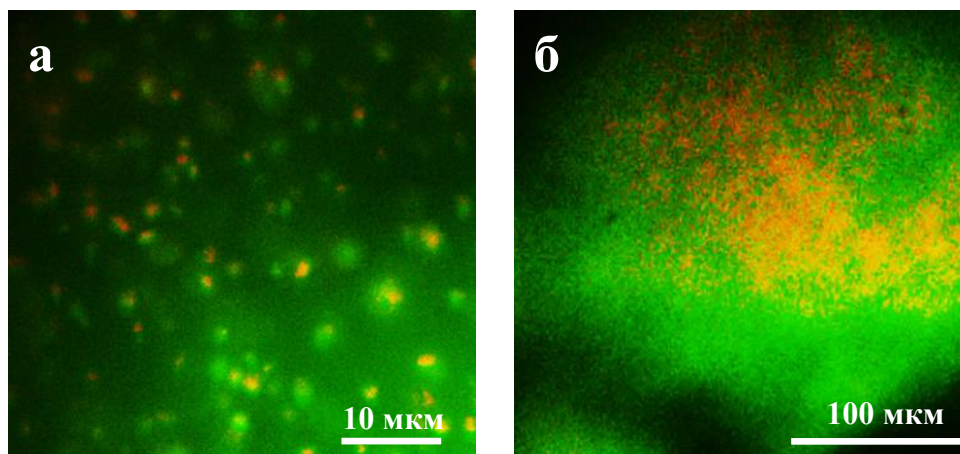


Рисунок 39 – Сохранение гранул в составе тромбоцитарного геля, полученного при 22°C. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. а – исходные тромбоциты; б – фрагмент тромбоцитарного геля, полученного с использованием препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» и 10%-ного раствора хлорида кальция.

В плазме с нормальным уровнем тромбоцитов с гранулами (35-75%) тромбоцитарный гель под действием 1 мМ адреналина и 35 мМ хлорида кальция формировался через 20-30 мин. Если уровень тромбоцитов с гранулами были снижен (10-35%), время образования геля увеличивалось до 50 мин. Если содержание тромбоцитов с гранулами в плазме составляло менее 10%, тромбоцитарный гель не формировался даже при очень длительной экспозиции. Таким образом, для получения тромбоцитарного геля наиболее пригодна плазма, полученная из крови с нормальным уровнем биологически полноценных тромбоцитов. Для формирования тромбоцитарного геля в БотП, выделенной при центрифугировании 300 g, общее содержание тромбоцитов с гранулами должно составлять не менее 100 тыс/мкл. На 100 мкл плазмы с тромбоцитами, выделенной при 300 g, необходимо внести 20-25 мкл препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» и 5-7 мкл 10%-ного раствора хлорида кальция. В зависимости от требуемого объема тромбоцитарного геля указанные объемы плазмы, препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал» и хлорида кальция следует кратно уменьшать или увеличивать.

In vitro в тромбоцитарном геле сразу после его формирования начинается процесс ретракции (сжатия) тромбофибринового сгустка в его составе, в

результате чего уже через 30-50 мин тромбоцитарный гель распадается на 2 фракции: нерастворимый гелеобразный тромбофибриновый сгусток (ТФ) и жидкую сыворотку, в которую выходит основная часть ростовых факторов и других биологически активных веществ, секретируемых тромбоцитами. Таким образом, если тромбоцитарный гель не используется непосредственно после изготовления, то даже при коротком хранении лишь небольшой его объем сохраняет гелевую консистенцию.

На примере культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека (ММСК) нами установлено, что ТФ, полученные стандартным способом при 37°C (метод-прототип), *in vitro* увеличивали рост клеток лишь в 1,1 раза (рис. 40а, б). В то же время, ТФ, полученные из БоТП с использованием оригинальной методики, увеличивали пролиферативную активность диплоидных клеток человека в 1,5-1,8 раза без видимого нарушения жизнеспособности клеток (рис. 40в, табл. 21).

Таблица 21 – Оценка рост-стимулирующего эффекта тромбофибриновых сгустков в культуре клеток ММСК.

Параметры оценки культуры ММСК	Способ получения ТФ					
	Контроль (Без ТФ) n=20		Метод-прототип (при 37°C) n=20		Оригинальный метод (при 22°C) n=20	
	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток	Через 1 сутки	Через 3 суток
ЦКМ, баллы (M±σ)	34,9±1,0	34,8±1,1	35,3±1,0	35,3±1,2	35,2±1,0	35,0±1,3
Плотность клеток, тыс/см <sup>2</sup> (M±σ)	8,1±0,5	15,6±1,4	8,2±0,7	17,2±1,3 *	8,0±0,5	25,7±0,7 * <sup>+</sup>
Содержание PDGF в ТФ, полученном из 0,5 мл БоТП, пг (M±σ)	нет		32±2		145±10	
* Достоверно относительно контроля при p<0,05 (t-критерий Стьюдента) <sup>+</sup> Достоверно относительно прототипа при p<0,05 (t-критерий Стьюдента) n – число наблюдений						

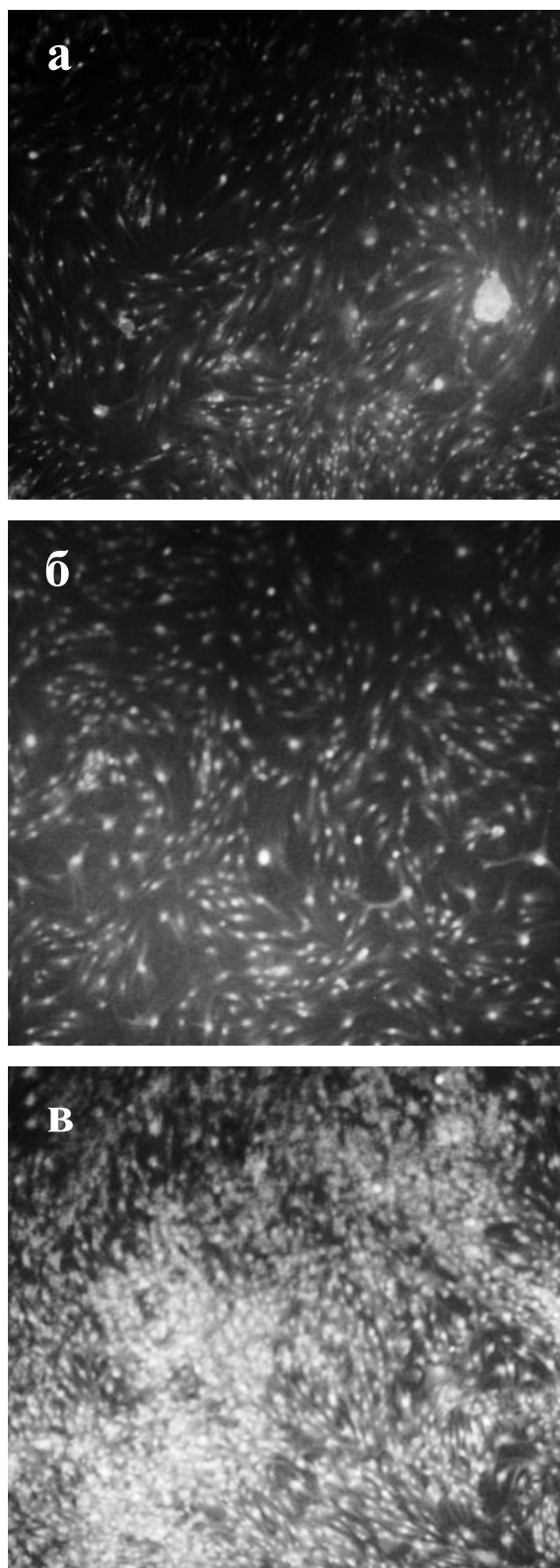


Рисунок 40 – Оценка пролиферативной активности клеток ММСК через 3 дня культивирования в присутствии и в отсутствии ТФ. Витальное окрашивание трипафлавином и акридиновым оранжевым. Увеличение  $\times 40$ . а – без ТФ (контроль); б – ТФ, полученный при  $37^{\circ}\text{C}$ ; в – ТФ, полученный оригинальным методом при  $22^{\circ}\text{C}$ .

Также оценивали насыщенность образцов ТФ ростовыми факторами, в частности тромбоцитарным фактором роста (PDGF). Для этого методом мультиплексного анализа оценивали уровень PDGF в лизате БоТП до образования ТФ, в сыворотке, полученной из той же БоТП при активации хлоридом кальция при 37°C, и в сыворотке, полученной из БоТП после активации при 20-22°C. Уровень PDGF в составе ТФ определяли по разнице уровня PDGF в лизате исходной БоТП и в сыворотке, полученной после выделения ТФ. Установлено, что уровень PDGF в ТФ, изготовленном при 20-22°C, в среднем был в 4,5 раз выше, чем в ТФ, полученном из той же БоТП при 37°C. Если при стандартной методике получения тромбоцитарного геля в составе ТФ сохранялось менее 12% от всего объема PDGF исходной БоТП, то при использовании оригинальной методики сохранность PDGF в ТФ превышала 50%.

Таким образом, предложенная нами методика приготовления тромбоцитарного геля позволяет получать тромбофибриновые сгустки, обладающие выраженным рост-стимулирующим эффектом. При этом получение тромбоцитарного геля не требует инкубации БоТП в термостате, использует широкодоступные в клинической практике реагенты и может быть осуществлено с помощью простого инструментария. Разработанный способ представляется весьма актуальным для изготовления раневых покрытий, насыщенных ростовыми факторами, а также при производстве тромбоцит-насыщенных биотрансплантатов.

### **7.3 Инкорпорирование тромбофибриновых сгустков с помощью микрокристаллической целлюлозы**

Наноструктурированная целлюлоза в настоящее время рассматривается как перспективный материал для получения различных органических матриц для клинических целей, в том числе – для задач регенеративной медицины. Использование целлюлозы позволяет получать биodeградируемые матрицы с высокой площадью поверхности и микроструктурой, кроме того, матрицы на основе целлюлозы обладают высокой пластичностью и биосовместимостью [122, 270]. Целлюлоза обладает высокими абсорбционными свойствами, что позволяет насыщать целлюлозные трансплантаты на основе целлюлозы суспензиями различных биологически активных веществ. Иначе говоря, целлюлозные матрицы могут обеспечить инкорпорирование растворенных компонентов, в том числе, выделенных из тромбоцитов. Также есть данные, что целлюлозные пленки обладают гемостатическим действием и способны активировать тромбоциты [270]. Было сделано предположение, что использование целлюлозы позволит ускорить формирование ТФ при 37°C, увеличить прочность готового трансплантата и повысить сохранность ростовых факторов в его составе.

В работе использовали микрокристаллическую целлюлозу «МКЦ Анкир-Б» (Эвалар, Россия). При контакте с микрокристаллической целлюлозой в БоТП образовывались мелкие агрегаты, в составе которых клетки дегранулировали в течение 10-20 мин как при 37°C, так и при 22°C (рис. 41). Очень часто агрегаты контактировали с кристаллами целлюлозы, при этом образования крупных агрегатов и полимеризации фибрина не наблюдалось. После добавления МКЦ в БоТП, активированную хлоридом кальция и препаратом «Адреналина гидрохлорид-Виал», уже через 5-10 минут наблюдалось формирование цельной гелеподобной массы (рис. 42), которая адсорбировала на себя весь тромбофибриновый сгусток и часть жидкой фракции БоТП. В оставшейся

плазме тромбоциты не выявлялись. Таким образом, все тромбоциты с гранулами целиком входили в состав конгломерата, образованного МКЦ.

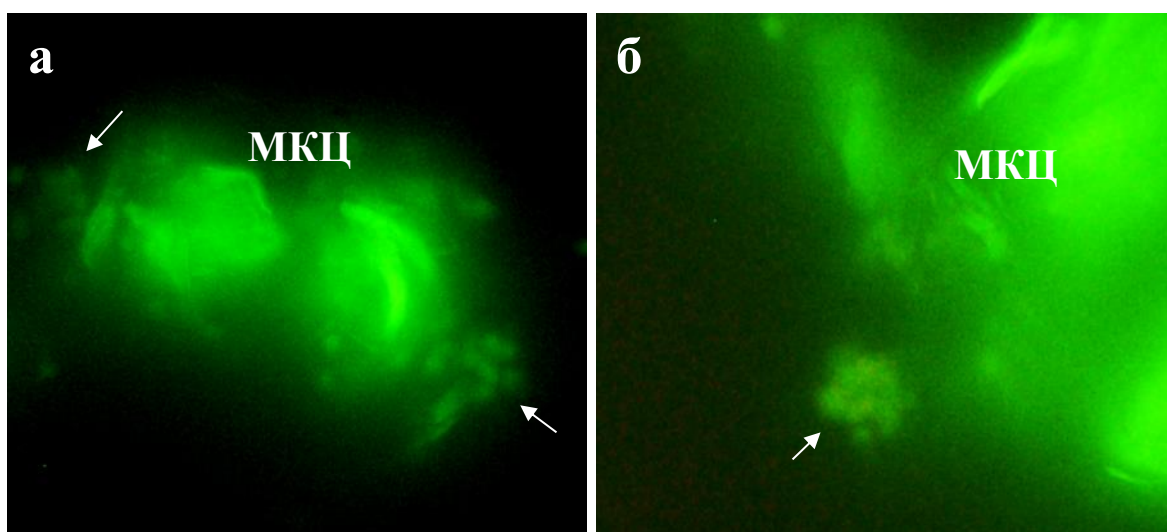
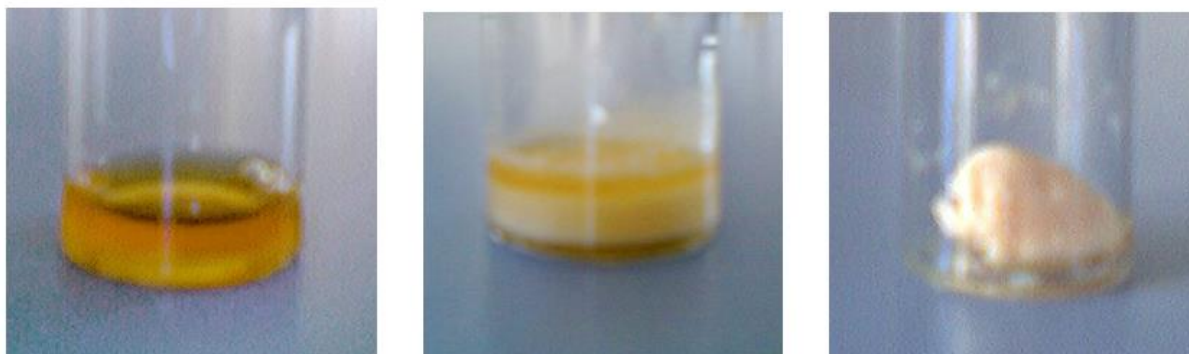


Рисунок 41 – Взаимодействие тромбоцитарных агрегатов с микрокристаллической целлюлозой (МКЦ). Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. а – увеличение x400, б – увеличение x800.

Агрегаты показаны стрелкой.

Полученный материал обладал высокой пластичностью, мог заполнять полости разной формы, при этом не наблюдалось выделения жидкой фракции. Это говорит о том, что все тромбоциты с гранулами были инкорпорированы внутри микроцеллюлозного матрикса. Экспериментальным путем было найдено оптимальное соотношение БоТП, МКЦ и активаторов: 2 мл БоТП смешивают со 100 мкл 10%-ного хлорида кальция и с 500 мкл препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал», затем в полученную смесь добавляют 500 мг МКЦ и инкубируют в течение 5 минут. В зависимости от необходимого объема готового препарата, объем БоТП, МКЦ и активаторов можно кратно уменьшать или увеличивать.

Исходная плазма с  
тромбоцитами



Введение 10%-ного хлорида кальция, препарата «Адреналина гидрохлорид -Виал» и микрокристаллической целлюлозы

Инкубация 5-10 мин при 20-22°C, затем удаление супернатанта

Рисунок 42 – Формирование единого конгломерата из МКЦ и БоТП, активированной при 22°C.

Исследование на примере культуры М-22 показало, что предложенная комбинация МКЦ и БоТП, активированной при 22°C, является нетоксичной для клеток, не снижается морфофункциональных характеристик. Отдельные кристаллы МКЦ создавали чисто физический барьер, препятствующий миграции и размножению клеток, при этом в областях, свободных от МКЦ, пролиферативная активность клеток была той же, что и в контроле (рис. 43). В опытах, где образцы МКЦ с активированной БоТП содержали оптимальное число тромбоцитов с гранулами в расчете на 100 тыс. высеванных клеток наблюдался выраженный рост-стимулирующий эффект (табл. 22). При более высоких объемах БоТП рост-стимулирующий эффект отсутствовал, но при этом также не наблюдалось подавления структурной целостности М-22.

Таблица 22 – Рост-стимулирующий эффект биопрепаратов на основе МКЦ и БоТП, активированной при 22°C.

Тип препарата	Число клеток через 3 суток культивирования, тыс/см <sup>2</sup> (M±σ)	Целостность клеточных мембран, баллы (M±σ)
Контроль 1 (Без МКЦ) n=20	15,5±1,2	35,0±1,0
Контроль 2 (с МКЦ без ТФ) n=20	15,0±0,9	35,1±1,0
МКЦ + ТФ. Содержание тромбоцитов с гранулами в исходной БоТП – 100 млн n=20	20,5±1,3*	35,1±1,0
МКЦ + ТФ. Содержание тромбоцитов с гранулами в исходной БоТП – 150 млн n=20	20,7±1,6*	35,3±1,1
МКЦ + ТФ. Содержание тромбоцитов с гранулами в исходной БоТП – 220 млн n=20	17,0±1,8	34,8±1,0
МКЦ + ТФ. Содержание тромбоцитов с гранулами в исходной БоТП – 270 млн n=20	14,7±0,6	34,7±1,0
* - различия с контролем 1 и 2 достоверны при p<0,05 (критерий Стьюдента для множественных сравнений) n – число наблюдений		

Можно заключить, что микрокристаллическая целлюлоза позволяет инкорпорировать тромбоциты и их компоненты в составе ТФ, полученного при 20-22°C с последующей реализацией их биологического материала. Это может очень перспективным при изготовлении раневых покрытий. Недостатком целлюлозы является отсутствие возможность ее метаболизма в организме человека, что затрудняет использование целлюлозных материалов при создании биотрансплантатов. Вместе с тем, обнаруженный нами эффект инкорпорирования тромбоцитов с помощью МКЦ имеет потенциальный интерес для научно-практической сферы. Для определения реальной эффективности целлюлозо-содержащих биопрепаратов необходимо комплексное исследование *in vivo*.



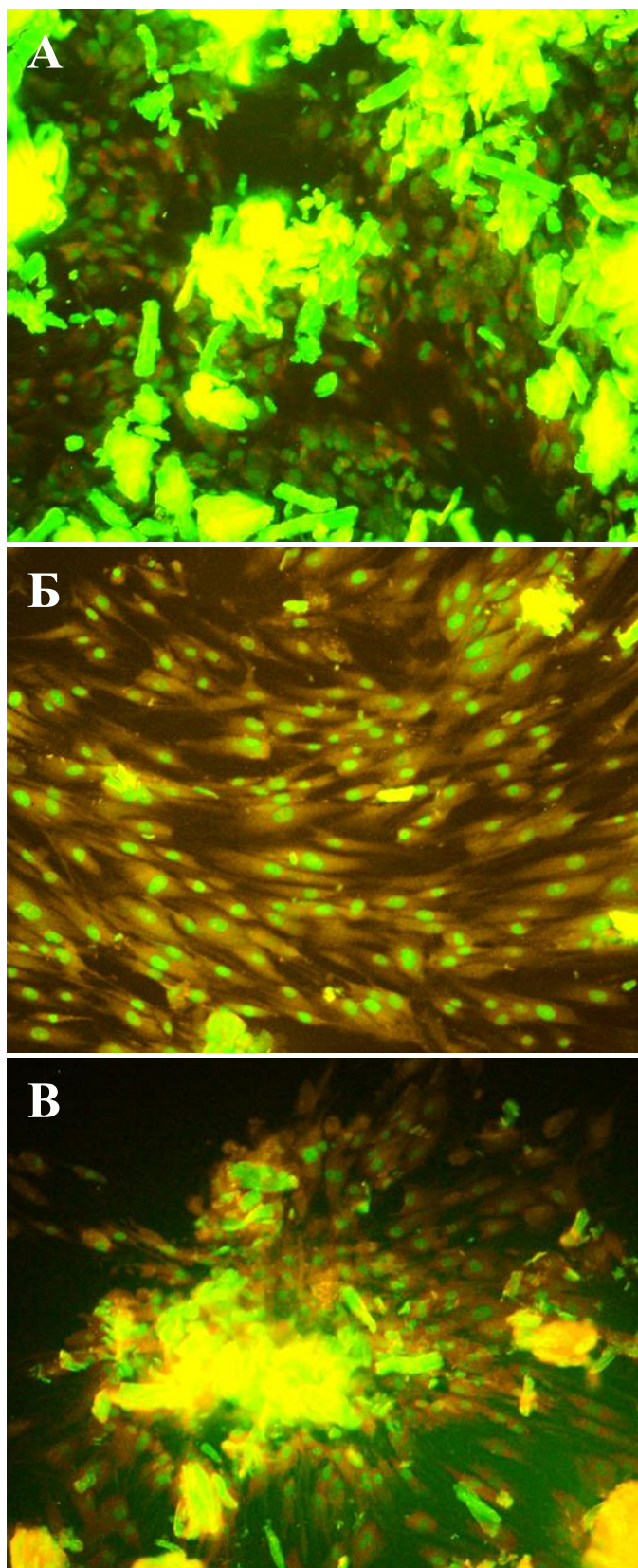


Рисунок 43 – Рост клеток линии М-22 через 3 суток культивирования в присутствии микрокристаллической целлюлозы. Витальное окрашивание трипропиламин-акридиновым оранжевым. Увеличение  $\times 400$ .  
А – МКЦ без ТФ; Б – МКЦ + ТФ, содержащий 100 млн тромбоцитов с гранулами; В – МКЦ + ТФ, содержащий 220 млн тромбоцитов с гранулами.

## ГЛАВА 8. РОСТ-СТИМУЛИРУЮЩИЕ, РЕПАРАТИВНЫЕ И РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ СВОЙСТВА АППЛИКАТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO И IN VIVO

### **8.1 Рост-стимулирующий эффект лизатов БоТП, полученных разными способами**

В культуре клеток можно исследовать биологический эффект самых разных биоконструкций и препаратов, в том числе, на основе тромбоцитов. На первом этапе исследовали пролиферативную активность и жизнеспособность клеток человека при добавлении в среду растворимых тромбоцитных препаратов в разных дозах. В работе использовали тромбоцитарные лизаты на основе БоТП, БедПл, актБоТП и ОтмТр. Ранее нами было установлено, что компоненты тромбоцитов оказывают дозозависимый рост-стимулирующий эффект на фибробласты человека линии М-22 [38]. Тогда в качестве источника факторов роста использовали сыворотку крови с известной концентрацией PDGF (от 5 до 75 пг на 1 мл среды). Наиболее интенсивный рост фибробластов был отмечен при уровне PDGF от 20 до 35 пг/мл, при более высоких дозах отмечали снижение численности клеток. Учитывая предыдущий опыт, в работе с фибробластами М-22 мы использовали дозы тромбоцитных препаратов объемом от 10 до 500 мкл в расчете на 1 лунку. 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 контрольные лунки препараты на основе тромбоцитов не вносили. Культивирование клеток проводили в 12-ти луночных планшетах, общее число высеянных клеток составляло 10 тысяч на лунку. Оценку рост-стимулирующего эффекта проводили через 3 суток культивирования (рис. 44, 45). При использовании БоТП наибольший рост-стимулирующий эффект в культуре М-22 наблюдался при 20 мкл БоТП, что соответствовало конечной концентрации PDGF 10 пг/мл.

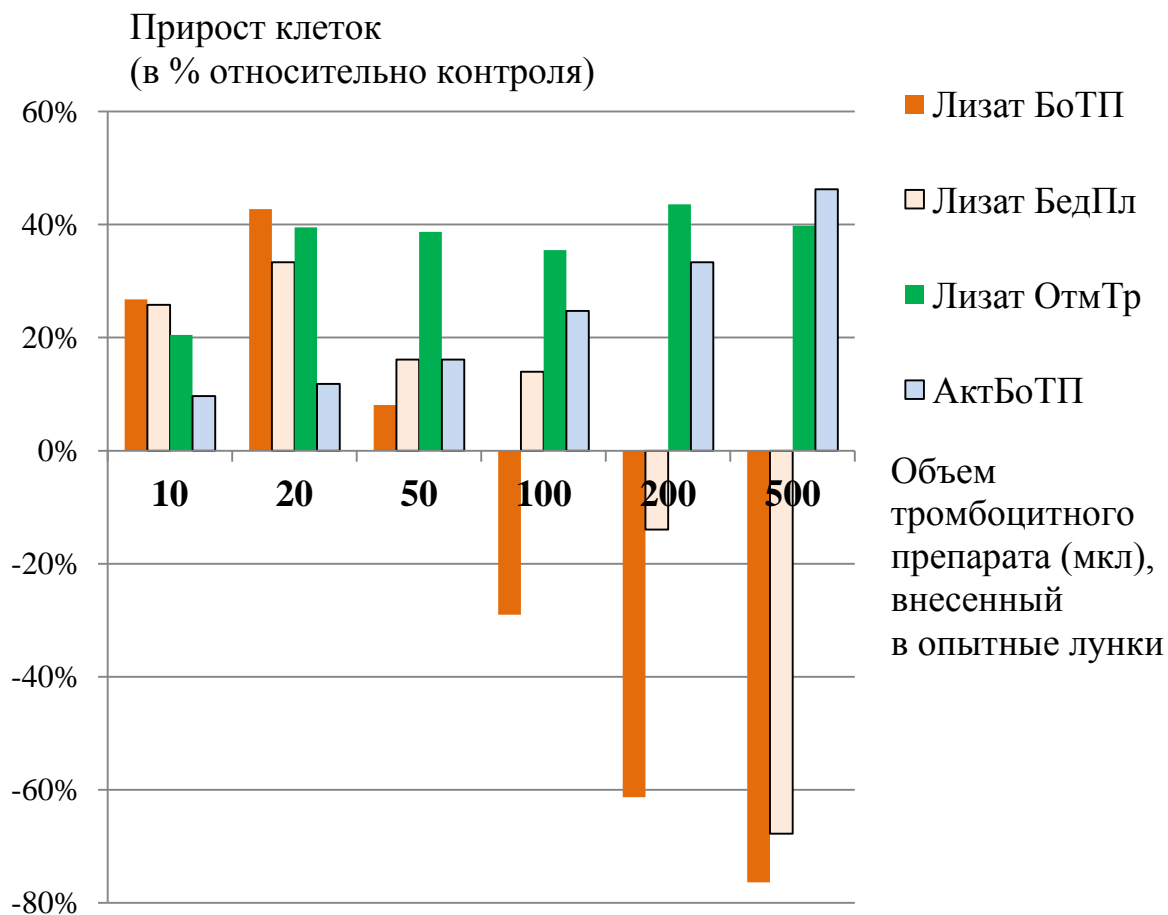


Рисунок 44 – Изменение количества фибробластов линии М-22 через 3 суток культивирования под действием тромбоцитных препаратов. Уровень 0% соответствует количеству фибробластов в контрольных лунках.

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. В присутствии высоких доз лизатов БоТП и БедПл подавление роста клеток сопровождалось изменением их морфологии, увеличением числа узких веретеновидных клеток и клеток полигональной формы, в клетках снижалось число секреторных везикул, выявляемых в процессе витального окрашивания (рис. 45Б, В, Г). При добавлении актБоТП максимальный стимулирующий рост эффект отмечен при дозе 500 мкл (концентрация PDGF 30 пг/мл). Таким образом, результаты были сопоставимы с полученными ранее данными о влиянии PDGF на рост фибробластов линии М-22. Однако при введении в культуру бедной тромбоцитами плазмы с низкими концентрациями PDGF был

также отмечен рост-стимулирующий дозозависимый эффект, аналогичный действию БоТП (рис. 44).

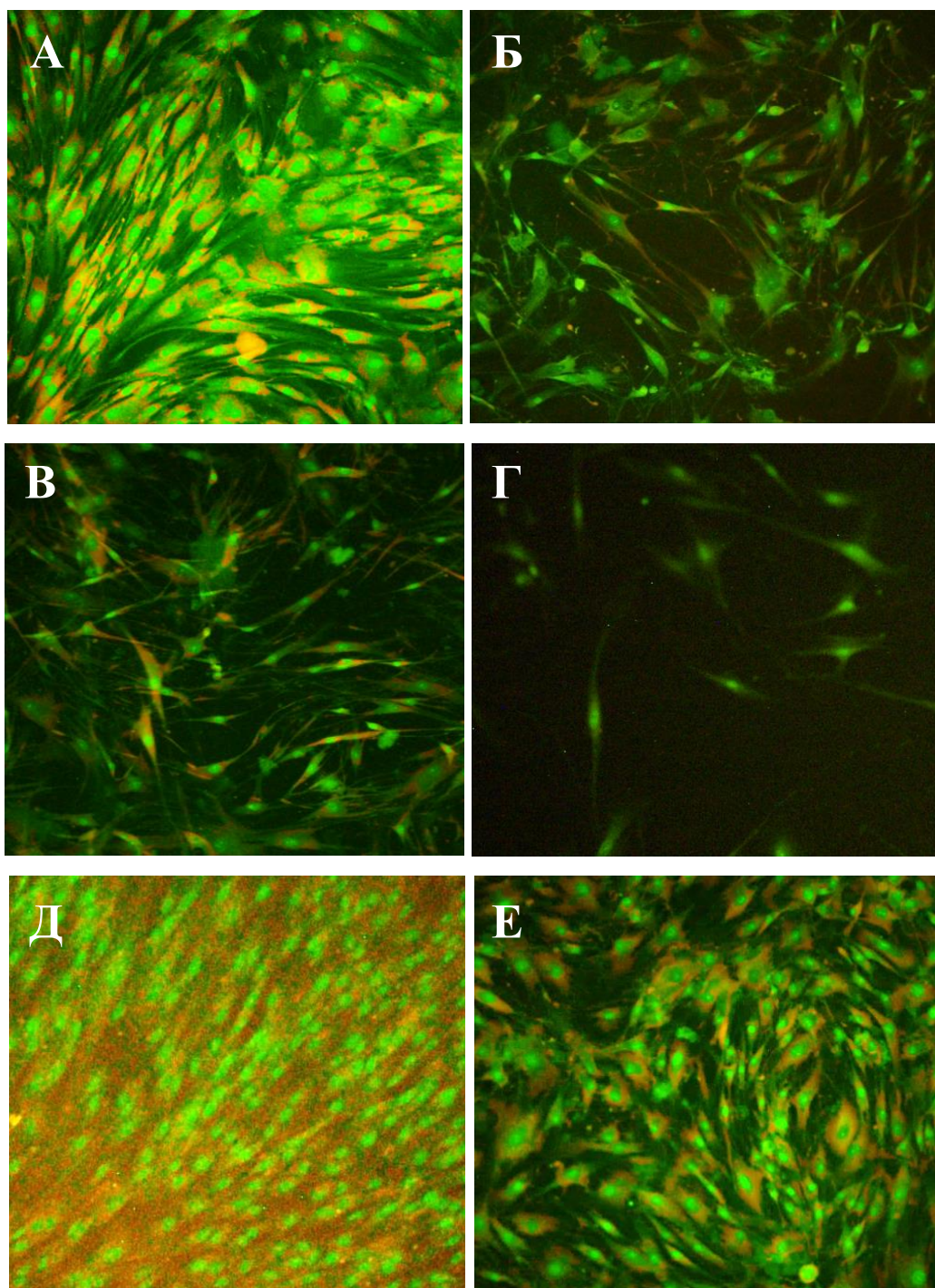


Рисунок 45 – Фибробласты человека линии М-22 через 3 суток культивирования под действием разных доз тромбоцитарных препаратов. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение  $\times 200$ .

А – 20 мкл лизата БоТП; Б – 100 мкл лизата БоТП; В – 100 мкл лизата БедПл; Г – 500 мкл лизата БоТП Д – 100 мкл лизата ОтмТр, Е – 500 мкл АктБоТП.

Максимальный эффект отмечен в опытах с 20 мкл БедПл (1,5 пг/мл PDGF), при 200 мкл (12 пг/мл PDGF) и более число клеток в культуре снижалось. В опытах с использованием тромбоцитов, отмытых от плазмы, стимуляция роста выявлена во всех лунках вне зависимости от концентрации PDGF, в опытах с актБоТП наблюдался дозозависимая стимуляция роста. Таким образом, использование препаратов, где тромбоциты изначально были в плазме, можно добиться как стимуляции и угнетения роста клеток. 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- $\alpha$ ; -0,445 ( $p=0,006$ ) для IL6; -0,411 ( $p=0,01$ ) для IL8. Также выявлена обратная корреляция между числом клеток и уровнем TGF- $\alpha$  ( $r=-0,431$ ,  $p=0,008$ ). Можно предположить, что при использовании избыточных доз тромбоцитарных препаратов *in vitro* ингибирующее действие оказывают большие концентрации провоспалительных цитокинов и TGF- $\alpha$ , а не ростовых факторов, как предполагалось ранее [38, 41]. С другой стороны, TGF- $\alpha$  очень часто синергетически связан с EGF, PDGF и другими факторами роста, т.е. для эффективной работы одного ростового фактора необходимы также другие факторы. Это также справедливо для интерлейкинов 1,6,8 [31, 49, 176]. Поэтому нельзя однозначно сказать, что подавление роста клеток связано только с тем или иным фактором, без учета его взаимодействия с другими компонентами БоТП.

В целом, можно заключить, что препараты на основе тромбоцитов человека обладают выраженным рост-стимулирующим эффектом в культуре фибробластов, однако требуется подбор адекватной дозы для предупреждения развития негативного ингибирующего действия. Необходимо дальнейшее изучение механизмов стимуляции и угнетения роста клеток препаратами на основе тромбоцитов.

## 8.2. Анализ структуры коллагена в составе тканевых трансплантатов

В работе с коллагеновыми матриксами и коллаген-насыщенными трансплантатами очень важно оценить структурную целостность трансплантата. Оценку качества тканевых трансплантатов часто проводят с помощью световой микроскопии, используя стандартные гистологические, реже – гистохимические методики [58, 82, 147]. В ходе гистологического исследования трансплантата большую роль играет анализ организации компонентов межклеточного матрикса, в первую очередь – коллагеновых волокон, при этом почти не уделяется внимания такому явлению, как автофлуоресценция. Способность к автофлуоресценции (свечению под действием возбуждающего света в отсутствие специальных флуорохромных красителей) является замечательным свойством коллагена [62], которое определяется его специфическим аминокислотным составом, трехмерной организацией целых молекул, а также комплексов из них (готовых коллагеновых фибрилл или волокон). Поэтому справедливо предположить, что оценка автофлуоресценции коллагена позволит оценить внутреннюю топографию тканевых трансплантатов, как на стандартных гистологических препаратах, так и при исследовании нефиксированных трансплантатов.

Автофлуоресценция коллагена регистрировалась как на цельных фрагментах обследованных трансплантатов, так и на гистологических препаратах, что позволяло видеть контуры коллагеновых волокон, их толщину и ориентацию. В составе коллагеновых повязок почти весь коллаген собран в волокна, чей уровень  $MFI_{кол}$  составлял 20-25 фут-кандел. В тканевых трансплантатах значение  $MFI_{кол}$  чаще всего было выше 25 фут-кандел (табл. 23), достигая наибольшего значения в трансплантатах ТМО и кортикальной кости, содержавших очень плотные и толстые волокна. Таким образом, используя параметр  $MFI_{кол}$ , представляется возможность оценивать степень компактизации коллагеновых волокон в составе трансплантатов разных типов.

Таблица 23 – Адгезивные характеристики тканевых трансплантатов в зависимости от интенсивности автофлуоресценции коллагеновых волокон

Типы коллаген-содержащих трансплантатов	Интенсивность автофлуоресценции коллагеновых волокон ( $MFI_{кол}$ ), фут-кандел	Адгезивная активность диплоидных клеток человека (фибробласты линии М-22)	Адгезивная активность тромбоцитов человека
Коллагеновые повязки, Дermalный матрикс,	8-30	Образуют конфлюэнтный или субконфлюэнтный монослой, активно пролиферируют	Образуют крупные скопления (до 100 мкм в диаметре)
Дermalный матрикс, Кожа доноров тканей	31-40	Адгезируют диффузно (без контакта с другими клетками) или образуют небольшие скопления	Образуют мелкие/ средние скопления или адгезируют диффузно
ТМО, кость,	51-90	Адгезируют одиночные клетки (на $1\text{мм}^2$ )	Не адгезируют

С другой стороны, уровень компактизации коллагена в составе готового трансплантата может быть изменен при последующих воздействиях. Использование тканевых трансплантатов как в клинической практике, так и при клеточно-тканевом инжиниринге часто подразумевает контакт трансплантата с факторами, способными влиять на структуру и топографию коллагеновых волокон в его составе. В настоящее время очень часто применяется процедура девитализации трансплантатов (удаление клеточных элементов из их состава) [71,85]. Производство девитализированных коллагеновых матриксов основано на использовании детергентов, растворов с высокой ионной силой и других химически активных веществ, потенциально способных нарушить исходную структуру коллагена и его топографию. В настоящей работе влияние девитализации исследовали на гистологических препаратах дермального матрикса, используя в качестве контроля препараты исходной кожи доноров тканей. Установлено, что в исходной коже химическая фиксация трансплантатов значимо не влияла на уровень  $MFI_{кол}$  – на гистологических препаратах кожи доноров тканей можно отчетливо наблюдать автофлуоресценцию коллагена по

всей площади среза (рис. 46), при этом наиболее интенсивное свечение отмечено у самых крупных волокон (35-40 фут-кандел). Параллельно регистрировалось слабое остаточное свечение цитоплазмы клеток, что может быть обусловлено действием фиксатора формалина, который способен усиливать флуоресценцию. На препаратах дермального матрикса отмечено снижение автофлуоресценции основной части волокон (до 25-28 фут-кандел), хотя в проходящем свете видимые изменения коллагеновых структур не выявлялись (рис. 47а).

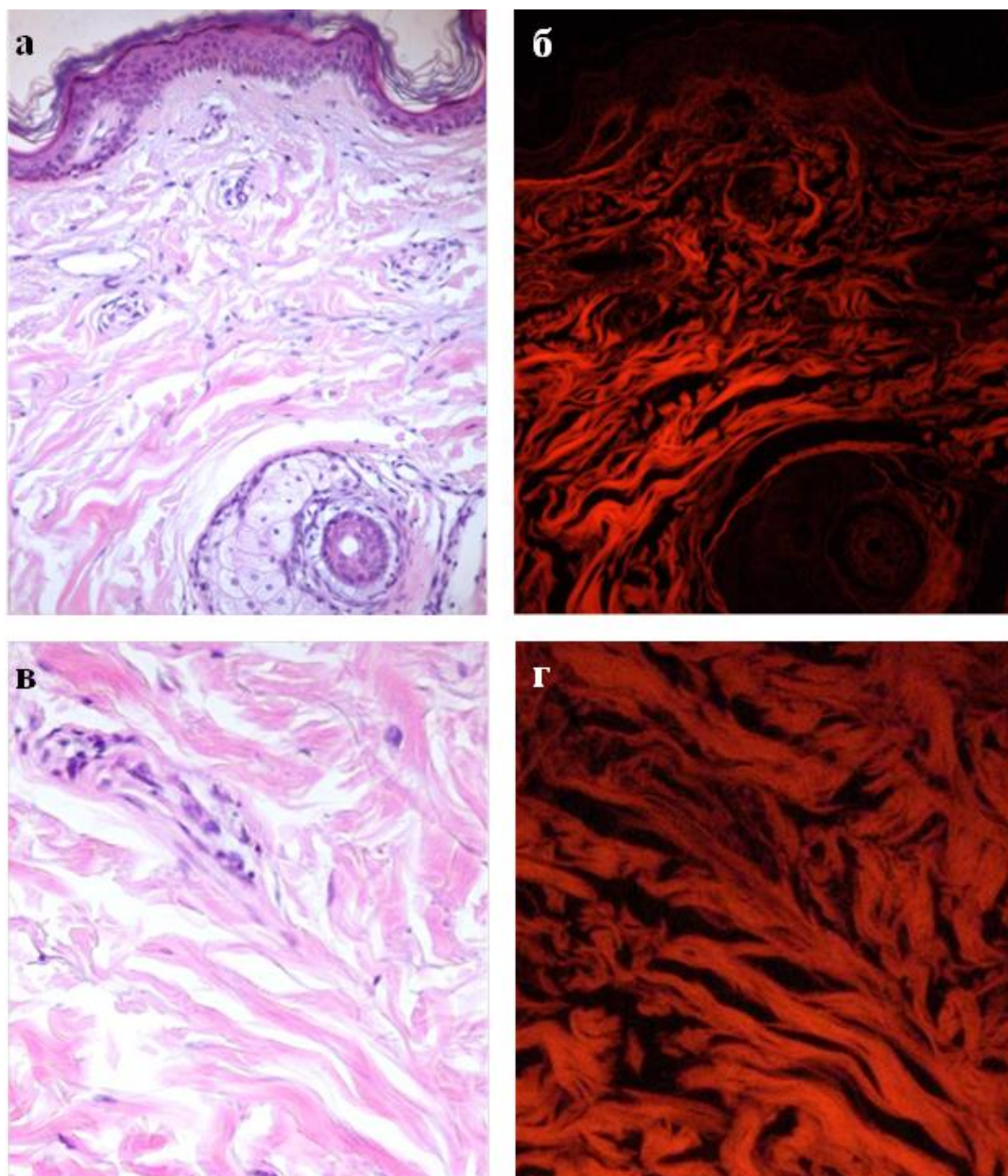


Рисунок 46 – Нативная кожа доноров тканей. Слева – окраска гематоксилином и эозином, справа – автофлуоресценция коллагеновых волокон. Увеличение x100 (верхний ряд) и x400 (нижний ряд).



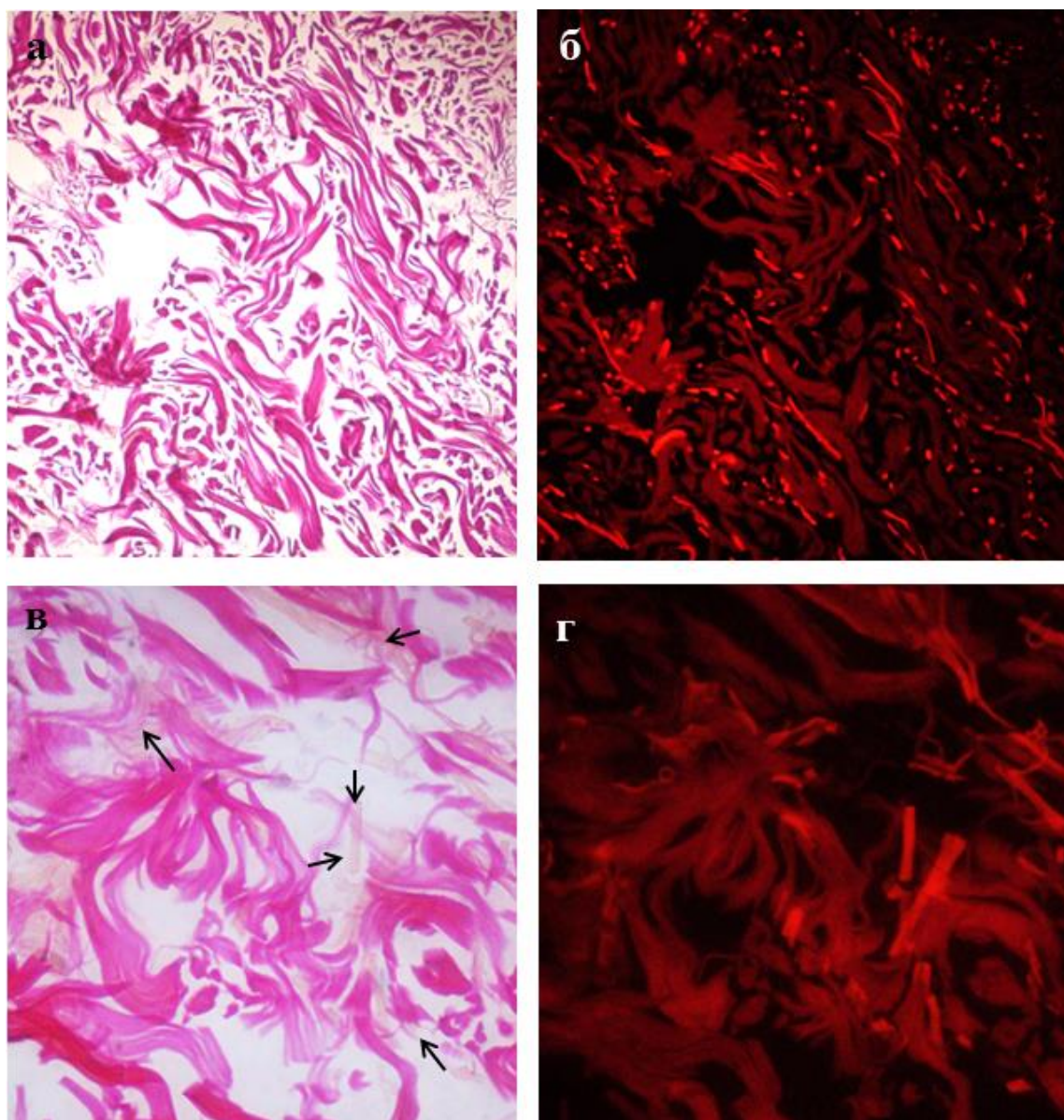


Рисунок 47 – Дermalный матрикс, полученный из кожи доноров тканей. Слева – окраска по Ван-Гизону, справа – автофлуоресценция коллагеновых волокон. Увеличение  $\times 100$  (верхний ряд) и  $\times 400$  (нижний ряд). Стрелками указаны пикринофильные волокна.

Наряду с этим, можно было обнаружить фрагменты очень ярких волокон с уровнем  $MFI_{кол}$  свыше 60 фут-кандел (рис. 47б,г), хотя при окрашивании гематоксилином и эозином такие волокна имели стандартную окраску, т.е. интенсивность автофлуоресценции здесь не была связана с компактизацией волокон. При окраске по Ван-Гизону волокна с  $MFI_{кол} \geq 60$  фут-кандел имели не характерный красный, а бледно-желтый или бледно-оранжевый цвет (рис. 47в),

т.е. были пикринофильными (адсорбирующими пикрин, желтый компонент красителя), чего никогда не наблюдалось в препаратах нативной кожи (рис. 46).

В клеточной биологии пикринофилия волокон рассматривается как явный признак деградации коллагена, нарушения его исходной структуры [20], т.е. в ходе процедуры получения дермального матрикса происходит необратимое разрушение части коллагеновых волокон. Примечательно, что во флуоресцентном микроскопе, при стимуляции автофлуоресценции коллагена пикринофильные волокна различимы гораздо лучше, чем в проходящем свете, даже при использовании окраски по Ван-Гизону. Это указывает на то, что анализ автофлуоресценции позволяет выявить сильно поврежденных волокон в составе трансплантатов, чей уровень  $MFI_{кол}$  в норме не превышает 60 фут-кандел. Стоит отметить, что пикринофильные волокна практически всегда присутствовали в образцах дермального матрикса, однако их количество на единицу объема значительно варьировало. Можно заключить, что использованная в нашей работе технология девитализации кожи не нарушает общей топографии коллагена в ее составе, однако способна вызвать деградацию отдельных волокон, а также их частичную деконденсацию. При этом деконденсация коллагеновых волокон не приводит к образованию в них структур с  $MFI_{кол} \geq 60$  фут-кандел. Кроме того, деконденсация, индуцированная сильной гипотонией, также не приводит к образованию пикринофильных волокон. Проведенное исследование показало, что после инкубации образцов кожи тканевых доноров в дистиллированной воде волокна с  $MFI_{кол} \geq 60$  фут-кандел не выявлялись, напротив, наблюдалось снижение интенсивности автофлуоресценции до 15 фут-кандел (рис. 48а), т.е. в данном случае, происходила деконденсация коллагеновых пучков без химической деградации коллагена. С другой стороны после длительного хранения лоскутов кожи при  $37^{\circ}C$  волокна с  $MFI_{кол} \geq 60$  фут-кандел выявлялись по всему объему дермы (рис. 48б), что свидетельствовало о полном химическом разрушении коллагена дермы. Оно могло быть обусловлено действием многих протеолитических ферментов, выделяемых разрушающимися клетками в процессе хранения.

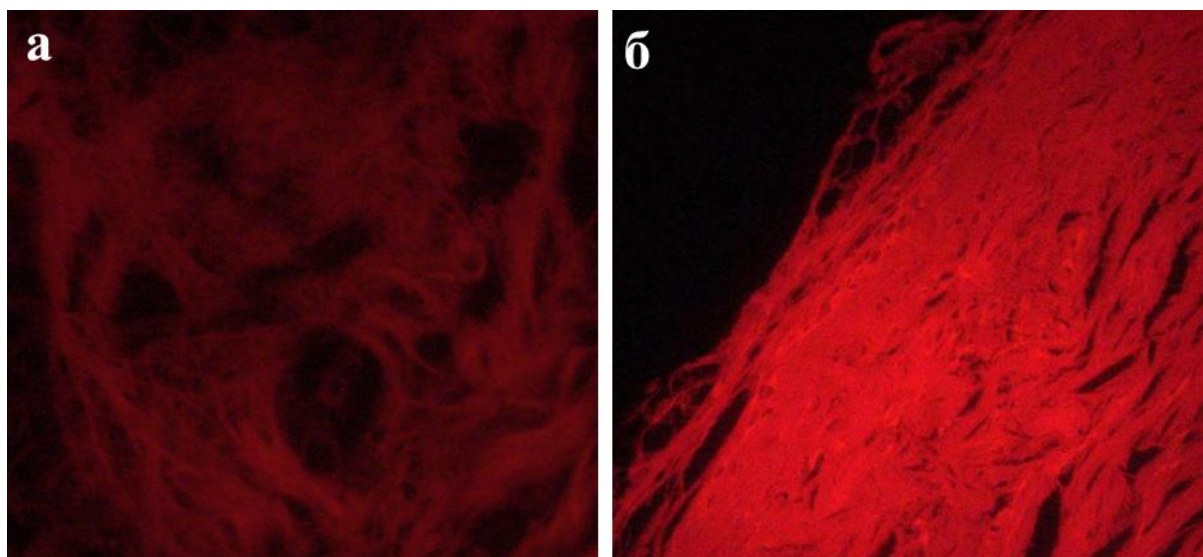


Рисунок 48 – Образцы кожи доноров тканей в условиях гипотонии (а) и после длительного хранения при 37°C (б). Автофлуоресценция коллагеновых волокон. Увеличение x400.

С другой стороны, независимо от того, ставится или нет задача полного приживания тканевого трансплантата, большую роль играет оценка его биосовместимости с нормальными клетками и тканями. В первую очередь, это подразумевает отсутствие токсического действия на культивируемые диплоидные клетки человека [58,172,241]. Кроме того, важным свойством тканевых трансплантатов являются их адгезивные характеристики. В зависимости от поставленных целей, требования к адгезивности трансплантатов могут варьировать – так, при клеточно-тканевом инжиниринге, производстве комбинированных биотрансплантатов используемая в их основе коллагеновая матрица должна быть высокоадгезивной для клеток. Напротив, при ряде хирургических вмешательств, таких как герниопластика, тканевые трансплантаты должны обладать анти-адгезивными свойствами. На примере использования линии диплоидных клеток человека (фибробласты М-22) и тромбоцитов человека нами выявлено, что адгезивность коллагеновых матриц зависела, в том числе, от плотности упаковки коллагена в их составе (табл. 23). Наиболее выражены адгезивные свойства у трансплантатов с  $MFI_{кол}$  не более 30 фут-кандел, т.е. именно такие коллагеновые трансплантаты наиболее

пригодны для использования в качестве матрицы при создании клеточно-тканевых конструкций. Адгезивность трансплантатов резко падала при уровне  $MFI_{кол}=40$  фут-кандел и выше – на таких трансплантатах слабо адгезировали фибробласты и совсем не адгезировали тромбоциты (табл. 23). Клетки обоих указанных типов полностью отсутствовали *in vitro* на образцах трансплантатов ТМО, которые в настоящее время считают весьма перспективными при лапароскопической герниопластике, пластике передней брюшной стенки при лечении вентральных грыж [1,20]. Применение ТМО в этих целях подразумевает отсутствие активной адгезии клеток на их поверхности. Проведенное исследование подтвердило высокие анти-адгезивные свойства трансплантатов ТМО

Анализ автофлуоресценции позволяет не только выявить коллагеновые волокна в составе соединительных тканей, но также оценить их структурную целостность и компактность. В гистохимии автофлуоресценцию гистологических препаратов принято рассматривать как ненужный артефакт, нарушающий общую картину флуорохромной окраски препарата [92]. Однако в отсутствие специального окрашивания флуорохромами регистрация автофлуоресценции коллагена может дать важную информацию о топографии соединительной ткани, сохранности межклеточного матрикса, а также позволит оценить его повреждение, в том числе – в нефиксированных тканях и трансплантатах. Это создает возможность динамического анализа коллагеновых структур при работе с клеточными культурами *in vitro*, при разработке и изготовлении новых типов комбинированных биотрансплантатов.

### **8.3 Взаимодействие диплоидных клеток с тканевыми трансплантатами, насыщенными активированной БоТП и лизатом БоТП**

Разработка трансплантатов, идентичных тканевым структурам, ведется с использованием широкого набора материалов, в том числе имеющих в основе коллаген человека. Коллаген-содержащие материалы используются как для получения новых типов биотрансплантатов, в т.ч. применяемых в клинической практике, так и для тестирования биологических свойств клеток. С помощью коллагеновых пленок оценивают пролиферативную активность клеток, их адгезивность, подвижность, а также механические и биофизические характеристики [118, 119]; при использовании трехмерных матриц появляется дополнительная возможность оценки процесса ремоделирования тканей, заселения исходных биотрансплантатов клетками. Показано, что комбинированные (содержащие клетки) коллагеновые биотрансплантаты имеют гораздо большую клиническую эффективность по сравнению простыми трехмерными матриксами [15, 58]. Вместе с тем, скорость и эффективность заселения клетками сильно варьирует в зависимости от типа коллагенового трансплантата, а также от структуры и топографии коллагеновых волокон [18, 58, 250]. Помимо этого, адгезия клеток на коллагеновых матриксах не всегда сопровождается их активной пролиферацией и миграцией во внутренние области трансплантата. Необходимо признать, что все исследования не содержат параметров, строго регламентирующих качество исходных тромбоцитов, а также их количество в расчете на 1 трансплантат. Таким образом, актуальным является оптимизация процедур использования тромбоцитов при изготовлении комбинированных трансплантатов.

В качестве клеточного компонента трансплантатов использовали первичную культуру клетки фибробластов кожи кадавера (ФКК), полученную по стандартной схеме [271]. Фибробласты кожи считаются одной из наиболее оптимальных клеточных культур для исследования взаимодействия клеток с коллагеновыми матриксами [118]. При контакте контрольных образцов

матрикса с суспензией ФКК в течение 1 суток оседание клеток на поверхности ГДК было гораздо менее выраженным, чем на коллагеновых повязках и дермальном матриксе (рис. 49). Более того, если на поверхности контрольных образцов коллагеновых повязок и ДМ прикрепившиеся фибробласты проявляли стандартную пролиферативную активность ( $ИП_3=1,5$ ), то в образцах ГДК пролиферативная активность практически отсутствовала в течение 3-х суток культивирования. Следовательно, использование ГДК в качестве простого 3-х мерного коллагенового матрикса при создании комбинированных биотрансплантатов малоэффективно. Также необходимо признать, что при зарегистрированном уровне оседания ФКК на поверхности коллагеновых повязок и дермального матрикса (не более 6 тыс/см<sup>2</sup> трансплантата) и  $ИП_3=1,5$  время формирования монослоя на поверхности указанных трансплантатов составит не менее 7 суток, т.е. скорость заселения трансплантатов будет довольно низкой. Поэтому для ускорения заселения коллагеновых матрикса клеток использовали рост-стимулирующие факторы из тромбоцитов БоТП человека.

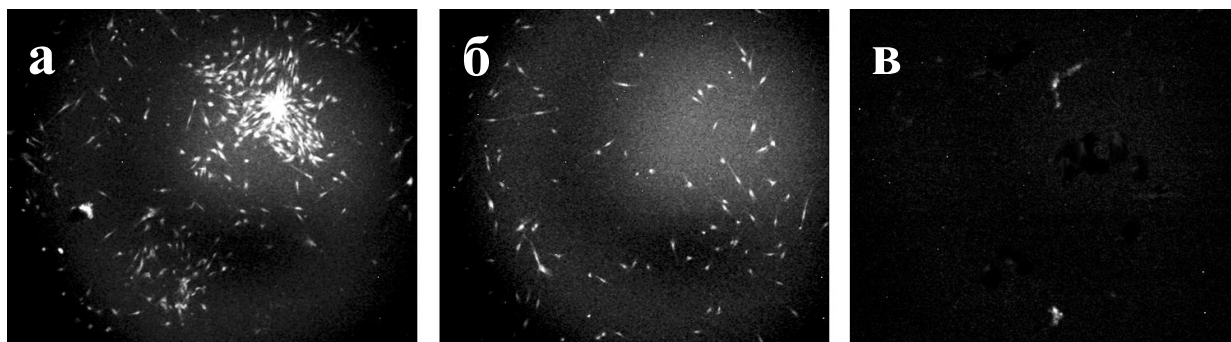


Рисунок 49 – Фибробласты кожи кадавера, осевшие из клеточной суспензии на поверхность коллагеновых матрикса в течение 1 суток эксперимента.

Витальное окрашивание трипафлавином-родамином С. а, – коллагеновая повязка; б – дермальный матрикс; в – губчатая деминерализованная кость.

Увеличение x50.

Перед применением препаратов БоТП необходимо было определить оптимальную дозу компонентов тромбоцитов для клеток культуры ФКК. На

примере культуры фибробластов линии М-22 нами ранее установлено, что наибольшая скорость клеточной пролиферации наблюдается при концентрации 120-150 пг PDGF-BB в расчете на 100 тыс. клеток при сохранении их исходной структурной целостности [38]. В этом случае значение индекса пролиферации на 3 сутки (ИП<sub>3</sub>) варьирует от 3,5 до 4,0 (в контроле без PDGF-BB – 1,5). В полученных образцах БоТП доноров содержание тромбоцитов с гранулами составляло 200-300 млн/мл, концентрация ростового фактора PDGF-BB в 1 дозе (100 млн тромбоцитов с гранулами) в 1 дозе активированной БоТП и лизата БоТП варьировала от 132 до 167 пг/мл, составляя в среднем 149 пг/мл. Таким образом, массовая дегрануляция 100 млн тромбоцитов с гранулами позволила получить необходимое количество PDGF-BB в расчете на 1 дозу. Исследование пролиферативной активности ФКК под действием PDGF-BB из БоТП показало, что при концентрации 60 пг PDGF-BB на 100 тыс. клеток параметр ИП<sub>3</sub> в культуре фибробластов кожи кадавера составил 1,7, при 90 пг – 2,2, при 120 пг – 2,7, при 150 пг – 3,0, при 180 пг – 2,4, при 240 пг – 1,5, тогда как в контроле этот параметр не превышал 1,4. Значение целостности клеточных мембран (ЦКМ) через 3-е суток культивирования в контроле и опыте с 60-150 пг PDGF-BB составило  $36,8 \pm 1,4$  баллов, в опыте с 180 пг –  $36,0 \pm 1,7$  баллов, в опыте с 240 пг –  $32,2 \pm 2,3$  балла при норме  $37,0 \pm 2,5$  баллов. Следовательно, концентрация 150 пг PDGF-BB являлась нетоксичной и наиболее эффективной для стимуляции клеточной пролиферации. С учетом того, что 150 пг PDGF-BB выделяется в среднем из 100 млн тромбоцитов с гранулами (биологически полноценные тромбоциты), удалось подтвердить эффективность такого количества тромбоцитарного материала в расчете на 100 тыс. культивируемых клеток культуры ФКК.

Следующим этапом исследования была отработка методики насыщения коллагеновых матриц компонентами тромбоцитов *in vitro* для придания им рост-стимулирующих свойств. Необходимо учитывать, что выход PDGF, а также других ростовых факторов, за пределы тромбоцитов может быть стимулирован

разными способами, такими как: 1) дегрануляция в процессе адгезии на субстрате; 2) дегрануляция под действием индуктора активации; 3) дегрануляция при образовании тромбофибринового сгустка под действием ионов кальция; 4) разрушение клеток под действием химических или физических факторов. Для осуществления насыщения коллагеновых матриксов использовали неактивированную БоТП (1 способ), БоТП, активированную 10%-ным хлоридом кальция (2 способ), лизат БоТП, полученный после 2-х часов заморозки тромбоцитов при  $-20/-40^{\circ}\text{C}$  (3 способ). Таким образом, получали повязки на основе коллагена I типа человека, дермальный матрикс и ГДК насыщенные компонентами тромбоцитов непосредственно перед внесением в суспензию ФКК для оценки рост-стимулирующего эффекта. В качестве контроля использовали необработанные коллагеновые матриксы.

При помещении обработанных коллагеновых матриксов в суспензию ФКК интенсивность заселения образцов коллагеновых повязок и дермального матрикса была близка к той, что отмечена в контроле. К концу 1-х суток количество адгезировавших клеток на поверхности этих субстратов составило в среднем 6,1 и 5,8 тыс/см<sup>2</sup>. В опыте с неактивированной БоТП наблюдалась массовая активация тромбоцитов, сопровождавшаяся их дегрануляцией, при этом непосредственный контакт с коллагеном (адгезия) наблюдался лишь у 10% тромбоцитов от их общего числа, а остальные 90% дегранулировали в среде, без образования тромбоцитарных агрегатов. При этом во всех опытах с коллагеновой повязкой и дермальным матриксом присутствие в среде тромбоцитарного материала значимо не влияло на адгезию фибробластов. На обработанных ГДК процесс оседания клеток из суспензии был выражен слабее: так, через 1 сутки культивирования в опыте с активированной БоТП и лизата БоТП количество адгезировавших клеток составило 1,3-1,4 тыс/см<sup>2</sup>, в опыте с неактивированной БоТП – 0,1 тыс/см<sup>2</sup>, т.е. было таким же, что и в контроле. Необходимо особо подчеркнуть, что адгезия тромбоцитов неактивированной БоТП на поверхности ГДК полностью отсутствовала.



Таблица 24 – Пролиферативная активность фибробластов кожи кадавера в составе коллагеновых матриц через 3 суток культивирования

Тип тромбоцитарного материала при культивировании	Количество клеток на поверхности матрикса, тыс/см <sup>2</sup> Me [25%; 75%]		
	Коллагеновая повязка	Дермальный матрикс	Губчатая деминерализированная кость
Контроль (n=12)	8,0 [7,1;10,5]	6,9 [6,3;7,4]	0,1 [0,1; 0,2]
неактивированная БоТП (n=12)	16,0 [15,7;17,0]*	10,5 [9,1;11,3]*	0,1 [0,1; 0,2]
актБоТП (n=12)	16,4 [16,0;17,6]*	13,5 [12,0;15,2]*	5,2 [4,7; 6,2]*
Лизат БоТП (n=12)	17,5 [16,5; 18,3]*	13,2 [12,0;15,9]*	4,9 [4,5; 5,3]*
*относительно контроля при $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни) n – число наблюдений			

Через 3 суток культивирования ФКК на коллагеновых повязках и дермальном матриксе с активированной БоТП и с лизатом БоТП количество адгезировавших клеток (КПК) были в среднем в 1,9-2,0 раза выше, чем в контроле; на образцах ГДК – почти в 50 раза (табл. 24). Это связано с тем, что на поверхности необработанных ГДК полностью отсутствовала пролиферация клеток. Через 3-4 суток на поверхности коллагеновых повязок и дермального матрикса был сформирован конфлюэнтный монослой клеток – площадь поверхности, занятая клетками, варьировала от 79 до 88 % (рис. 50а,б), при этом не наблюдалось видимых структурных нарушений как в клетках в составе матриц (ЦКМ=36,5±1,3 балла, рис. 46а',б'), так и в клетках, растущих на дне чашки (ЦКМ=36,6±0,9 балла). В опытах с ГДК через 3-е суток монослой отсутствовал, однако размножение клеток наблюдалось в течение более поздних сроков культивирования в присутствии активированной БоТП или лизата БоТП.

В результате через 7-8 суток на поверхности ГДК было отмечено формирование конфлюэнтного монослоя при сохранении структурной целостности клеток (рис. 49в, в').

В опытах с неактивированной БоТП через 3-е суток культивирования ФКК на коллагеновых повязках и дермальном матриксе параметры КПК и ИП<sub>3</sub> превышали аналогичные значения в контроле в 1,53-1,6 раза, конфлюэнтный монослой на поверхности трансплантатов формировался через 4 суток, т.е. пролиферативная активность клеток в этом случае была менее выраженной, чем в других опытах, однако достоверно выше контрольной. В опытах с ГДК пролиферативная активность клеток в составе биотрансплантатов отсутствовала (табл. 24); у клеток, растущих на дне тех же чашек, также не наблюдалось ускорения роста клеток. При этом отмечено резкое снижение числа тромбоцитов с гранулами в среде – если в исходной БоТП их относительное содержание составляло 60%, то через 3 суток опыта – всего 17%. По всей видимости, постепенное разрушение неактивированных тромбоцитов не сопровождалось выходом ростовых факторов в концентрациях, достаточных для ускорения роста ФКК. Это подтверждает данные о том, что в процессе хранения тромбоцитной массы при комнатной температуре и постоянном помешивании снижение качества и гибель тромбоцитов не связано с выходом гранул за их пределы, а обусловлено сугубо внутриклеточными процессами. Отсутствие адгезии тромбоцитов на поверхности ГДК может быть обусловлена недоступностью центров связывания для тромбоцитарных интегринов вследствие очень высокой плотностью упаковки коллагена или их экранирования не-коллагеновыми белками кости [300]. Этот фактор также может быть причиной низкой адгезии культивируемых клеток на поверхности ГДК.

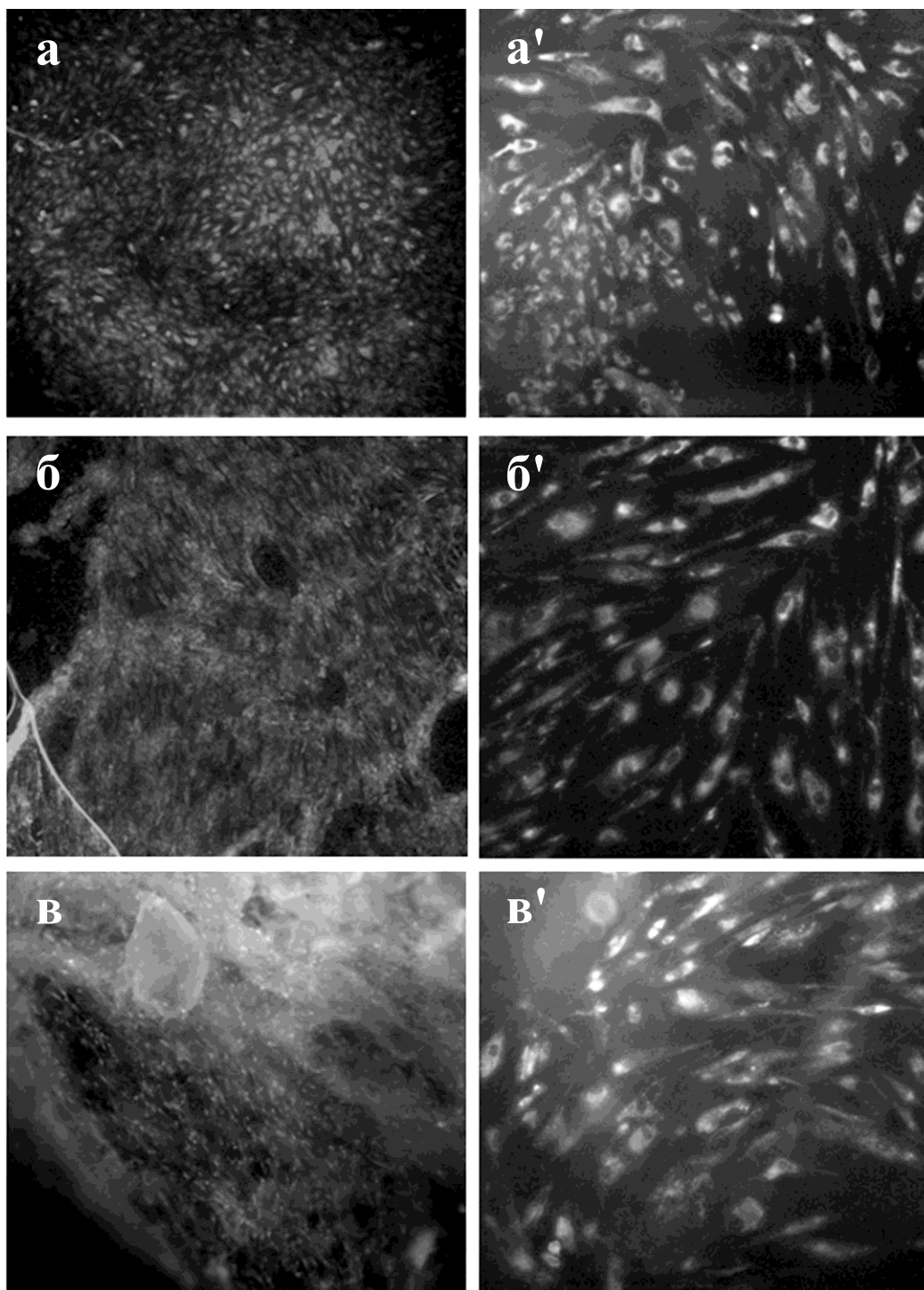


Рисунок 50 – Формирование монослоя фибробластов кожи кадавера на поверхности коллагеновых матриксов в присутствии тромбоцитарного материала активированной БоТП. Витальное окрашивание трипафлавином-родамином С. Увеличение  $\times 50$  (левый ряд) и  $\times 400$  (правый ряд).  
 а, а' – коллагеновая повязка (через 3 суток культивирования);  
 б, б' – дермальный матрикс (через 4 суток культивирования);  
 в, в' – ГДК (через 7 суток культивирования).

Однако обработка активированной БоТП или лизатом БоТП позволяет в значительной степени снять эту проблему; по всей видимости, это связано с частичной декомпактизацией плотных коллагеновых фибрилл под действием гидролаз и других лизосомных факторов, выделенных тромбоцитами. Миграция фибробластов во внутренние области трансплантатов, насыщенных тромбоцитарными компонентами, в течение всего срока культивирования была довольно умеренной и происходила лишь за счет активности клеток поверхностного монослоя. Через 7 суток культивирования максимальная глубина проникновения ФКК в образцах дермального матрикса составила 20 мкм, в образцах ГДК – 10 мкм независимо от обработки тромбоцитов БоТП.

Таким образом, насыщение коллагеновых матриксов тромбоцитными препаратами давало рост-стимулирующий эффект, когда тромбоцитарные компоненты могли непосредственно взаимодействовать с клетками в культуре, т.е. были в растворенном виде и или выходили из тромбоцитов в процессе их активации. Кроме того, большое значение играет концентрация компонентов тромбоцитов. Доза ростовых факторов, извлеченная из 100 млн тромбоцитов с гранулами, представляется наиболее эффективной и нетоксичной на 100 тыс высеянных клеток. С другой стороны, необходимо отметить, что в большинстве случаев заселение клетками происходило главным образом на поверхности трансплантатов и в областях глубиной не более 10-20 мкм. Более глубокое проникновение клеток зарегистрировать не удалось; вместе с тем, миграция отдельных фибробластов со дна чашек Петри а также с поверхности трансплантатов во внутренние их участки наблюдалась и спустя 7 суток культивирования. Можно предположить, что для полного заселения коллагеновых матриксов клетками требуются более длительные сроки культивирования. Тем не менее, использование материала биологически полноценных тромбоцитов позволяло значительно ускорить заселение клетками коллагеновых матриксов.

#### **8.4 Рост-стимулирующие свойства тромбоцитов, стабилизированных наночастицами серебра**

Неорганические наночастицы обладают высокой проникающей способностью и во многих случаях способны вызывать различные цитотоксические реакции. В связи с этим важно было *in vitro* исследовать структурную целостность и пролиферативную активность диплоидных клеток в процессе их контакта с матриксами, насыщенными тромбоцитами, которые предварительно были стабилизированы наночастицами серебра. Также было необходимо определить оптимальный уровень стабилизированных тромбоцитов в составе коллагеновых повязок.

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/см<sup>2</sup>. В опытах без стабилизации тромбоцитов в диапазоне от 40 до 120 млн тромбоцитов с гранулами на 100 тыс. высевных ММСК общее количество клеток через 3 суток составляло 9,2-10,6 тыс/см<sup>2</sup>, т.е. даже при различии концентраций тромбоцитов с гранулами в 2 и более раз ростовой эффект значимо не менялся. В среднем, использование 40-120 млн нестабилизированных тромбоцитов с гранулами увеличивало пролиферативную активность ММСК в 1,5 раза. При стабилизации тромбоцитов с гранулами в диапазоне от 20 до 120 млн на 100 тысяч ММСК рост-стимулирующий эффект заметно усиливался (табл. 25, рис. 51). При этом в условиях предварительной инкубации тромбоцитов с 2,5 мкМ наночастиц серебра максимальный рост пролиферативной активности ММСК отмечен при концентрации 61-80 млн тромбоцитов с гранулами (в 2,6 раза по сравнению с контролем). В то же время при стабилизации тромбоцитов наиболее интенсивный рост ММСК наблюдали при содержании тромбоцитов с гранулами 101-120 млн (в 2,5 раза по сравнению с контролем).

Таблица 25 – Пролиферативная активность ММСК через 3 суток культивирования в присутствии коллагеновых покрытий с тромбоцитами

Содержание тромбоцитов с гранулами в расчете на 100 тысяч ММСК, млн	Число ММСК на коллагеновом матриксе, тысяч клеток на 1 см <sup>2</sup>		
	<b>1-я опытная группа</b> Тромбоциты без стабилизации наносеребром  M±σ	<b>2-я опытная группа</b> Предварительная инкубация тромбоцитов с 2,5 мкМ наносеребра M±σ	<b>3-я опытная группа</b> Стабилизация адгезирующих тромбоцитов с помощью 5 мкМ наносеребра M±σ
0 (контроль)	6,5 ± 1,1 (n =30)		
20-40	9,2 ± 0,9* (n =40)	11,5 ± 1,2** <sup>+</sup> (n =43)	9,1 ± 0,6* (n =36)
41-60	9,4 ± 1,1* (n =47)	12,9 ± 0,9** <sup>+</sup> (n =59)	11,7 ± 1,1** <sup>+</sup> (n = 50)
61-80	9,7 ± 1,1* (n =27)	17,1 ± 2,4** <sup>+</sup> (n = 25)	12,3 ± 1,6* ** <sup>+</sup> (n = 26)
81-100	10,6 ± 1,6* (n =26)	16,6 ± 2,2** <sup>+</sup> (n = 28)	15,5 ± 1,7** <sup>+</sup> (n =28)
101-120	10,5 ± 0,7* (n =22)	11,6 ± 1,8** <sup>+</sup> (n =24)	16,6 ± 1,0* ** <sup>+</sup> (n =26)
130-170	8,2 ± 1,8* (n =26)	7,4 ± 1,9 (n = 25)	6,5 ± 1,4 <sup>+</sup> (n = 24)
180-240	7,0 ± 1,4 (n =24)	6,0 ± 0,8* (n =24)	5,4 ± 1,6* (n = 30)
250-400	4,9 ± 1,1* (n =24)	5,4 ± 1,9* (n =24)	3,7 ± 0,7* (n = 26)
500 - 550	2,6 ± 0,9* (n = 18)	1,4 ± 0,8* (n = 24)	2,3 ± 0,9* (n = 18)
<p>* - различия с контролем достоверны при p&lt;0,05</p> <p>** - различия между 2-й и 3-й группой достоверны при p&lt;0,05</p> <p><sup>+</sup> - различия с 1-й группой достоверны при p&lt;0,05 (критерий Стьюдента для множественных сравнений)</p> <p>n – число наблюдений</p>			

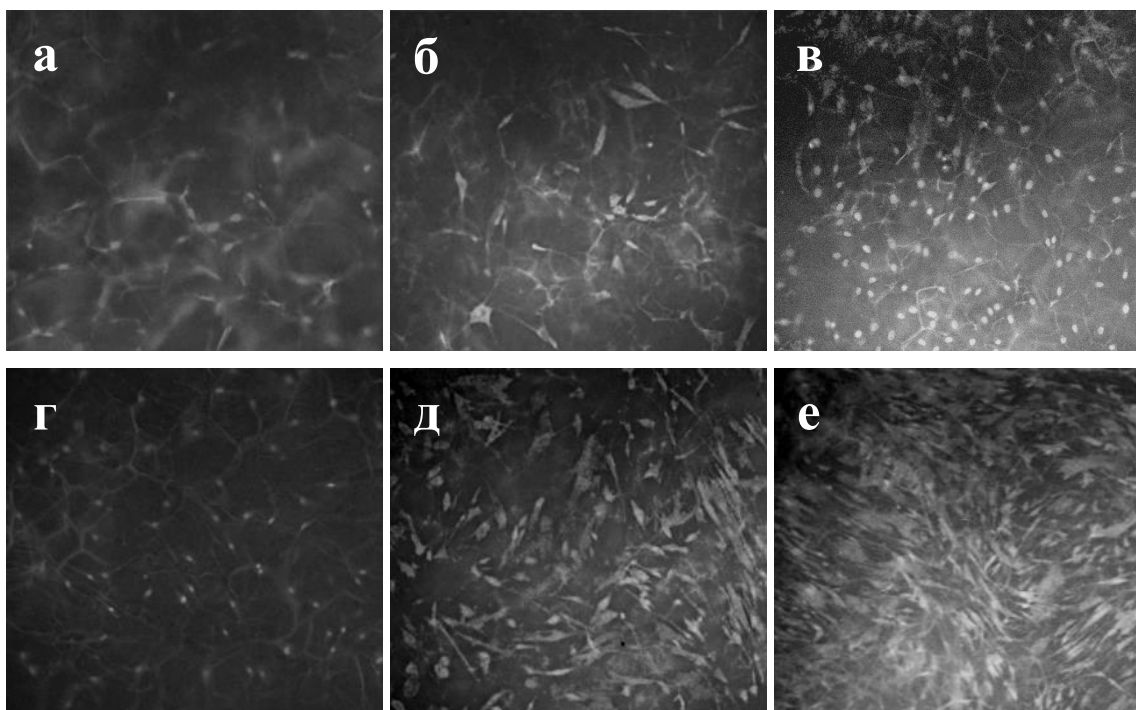


Рисунок 51 – Рост ММСК на коллагеновых повязках через 3 суток (верхний ряд) и 7 суток (нижний ряд) культивирования. Витальная окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение  $\times 100$ .

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, предварительно стабилизированных 5 мкМ наносеребра.

В целом, в диапазоне 20-120 млн стабилизированных тромбоцитов на 100 тыс. ММСК наблюдался выраженный дозозависимый эффект стимуляции роста *in vitro* (табл. 25) при сохранении структурной целостности клеток. При 130-170 млн тромбоцитов с гранулами ростовой 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; в опытных образцах у многих клеток наблюдалось нарушение адгезивной и секреторной активности. При этом на дне чашки Петри (вне повязки) ингибирование роста было выражено заметно меньше.

Оба способа стабилизации увеличивают рост-стимулирующий эффект тромбоцитарного материала в составе повязок, однако предварительная инкубация с наночастицами представляется более удобной и эффективной. Поэтому такой способ стабилизации использовался и при более длительном культивировании ММСК. Через 7 суток в опытах с 90-100 млн стабилизированных тромбоцитов (стабилизация путем предварительной инкубации с 2,5 мкМ наночастиц серебра) на поверхности коллагеновой повязки формировался выраженный конфлюэнтный монослой, содержащий в среднем  $24,1 \pm 0,5$  тыс ММСК на  $\text{см}^2$ , параллельно наблюдалась миграция клеток вглубь матрикса и на его противоположную сторону. В то же время в контрольных образцах (без тромбоцитов) содержание ММСК через 7 суток составило всего  $8,0 \pm 0,9$  тыс/ $\text{см}^2$ , в опытах с 90-100 млн тромбоцитов без стабилизации –  $16,5 \pm 0,4$  тыс/ $\text{см}^2$ , причем в обоих случаях клетки на противоположной стороне матрикса отсутствовали. Через 14 суток культивирования в контроле был выявлен субконфлюэнтный (неплошной) монослой, количество клеток составляло  $15,5 \pm 0,7$  тыс/ $\text{см}^2$ , тогда как во всех опытах с 90-100 млн тромбоцитов образовывался конфлюэнтный (сплошной) монослой, содержащий 24-25 тыс. ММСК на  $1 \text{ см}^2$ , без видимых структурных повреждений клеток. Однако миграция ММСК в матриксе была гораздо более выраженной в опытах, где тромбоциты были предварительно стабилизированы – в этом случае содержание ММСК на обратной стороне матрикса составило  $6,0 \pm 0,2$  тыс/ $\text{см}^2$ , тогда в опыте без стабилизации –  $1,6 \pm 0,1$  тыс/ $\text{см}^2$ .

Использование наночастиц серебра увеличивает сохранность биологического потенциала тромбоцитов в составе трансплантата в условиях смены или удаления жидкой среды. Это позволило значительно повысить пролиферативную и миграционную активность диплоидных клеток в составе коллагеновых матриксов, насыщенных стабилизированными тромбоцитами. Нужно отметить, что в опытах по предварительной инкубации тромбоцитов с наносеребром максимальный рост пролиферативной активности ММСК отмечен при более низкой концентрации тромбоцитов с гранулами. Это может быть



связано с тем, что при разных способах стабилизации сохраняется разное количество гранул в расчете на 1 тромбоцит; кроме того, стабилизация тромбоцитов на ранней стадии адгезии не препятствует формированию ими уплощенных агрегатов, в составе которых тромбоциты дегранулируют более активно, чем при адгезии одиночных клеток. С другой стороны, 101-120 млн тромбоцитов с гранулами, стабилизированные в начале их адгезии, давали наиболее высокий рост-стимулирующий эффект. В целом, наиболее эффективные концентрации стабилизированных тромбоцитов с гранулами увеличивали рост ММСК на коллагеновых повязках в среднем в 2,6 раза без нарушения жизнеспособности клеток и стимулировали их миграцию в более глубокие слои матрикса. Необходимо учитывать короткий срок жизни тромбоцитов и секретируемых ими факторов. При длительном культивировании клеток в составе биотрансплантатов (1 месяц и выше) однократное насыщение матриксов стабилизированными тромбоцитами может быть недостаточным. С другой стороны, не исключено повторное введение суспензии стабилизированных тромбоцитов в матриксы и биоконструкции.

Таким образом, насыщение коллагеновых матриксов стабилизированными тромбоцитами заметно повышает их биокондуктивные и рост-стимулирующие свойства в культуре клеток. Это позволяет с уверенностью предположить, что тромбоцит-насыщенные матриксы позволят реализовать биологический и репаративный потенциал тромбоцитов при лечении ран *in vivo*.

## 8.5 Изучение репаративного эффекта тромбоцитов в эксперименте

### 8.5.1 Лечение экспериментального ожога

Через 3 суток у обследованных животных с экспериментальным ожогом IIIa степени марлевый тампон легко отделялся от раневого покрытия. Раневое покрытие было плотно фиксировано на ране. 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 (рис. 52). В контрольной группе во многих участках дермы отмечено заметное изменение структуры волокон межклеточного матрикса. Интенсивность автофлуоресценции коллагеновых волокон ( $MFI_{кол}$ ) в нормальных участках дермы варьировала от 35 до 45 фут-кандел составляла в среднем  $39 \pm 3$  фут-кандел. В то же время, в области раны у многих волокон  $MFI_{кол}$  была повышенной (50-70 фут-кандел), также выявлялись волокна со сниженной  $MFI_{кол}$  (25-30 фут-кандел), в среднем в дне раны значения  $MFI_{кол}$  составляли  $49 \pm 5$  фут-кандел и были достоверно выше, чем в здоровой дерме ( $p < 0,05$ ). Коллагеновые волокна с  $MFI_{кол}$  выше 60 фут-кандел при окрашивании по Ван-Гизону обладали выраженной пикринофилией (рис. 53), которая является признаком химической деформации коллагена и его разрушения [62]. Такие волокна и встречались как на поверхности раны, так и в более глубоких слоях, в том числе, в сетчатом слое дермы рядом с подкожно-жировой клетчаткой. Волокна со сниженным уровнем  $MFI_{кол}$  имели характерный отечный вид и выявлялись по всей глубине дермы. У всех обследованных животных отмечена интенсивная инфильтрация дна раны клетками воспаления, при этом воспалительный инфильтрат имел смешанный состав. Интенсивная инфильтрация отмечалась также в подлежащих тканях. Плотность инфильтрации клетками воспаления составляла в среднем  $145 \pm 19$  клеток/ $мм^2$  в дне раны и  $110 \pm 12$  клеток/ $мм^2$  в подлежащих тканях.

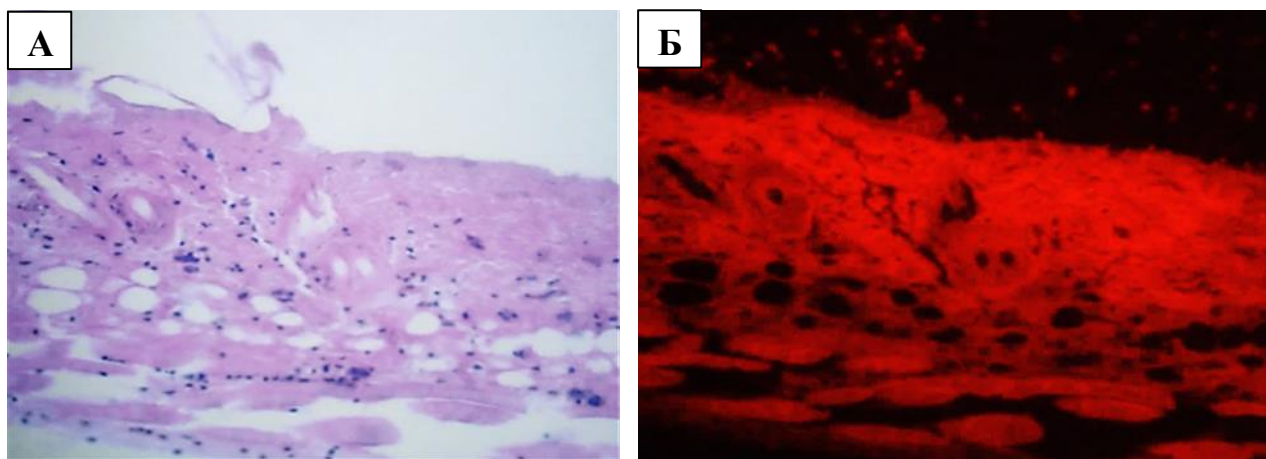


Рисунок 52 – Дно экспериментальной ожоговой раны при лечении коллагеновой повязкой (контрольная группа) через 3 суток эксперимента. Увеличение  $\times 100$ . А – окраска гематоксилином и эозином, Б– автофлуоресценция коллагеновых волокон.

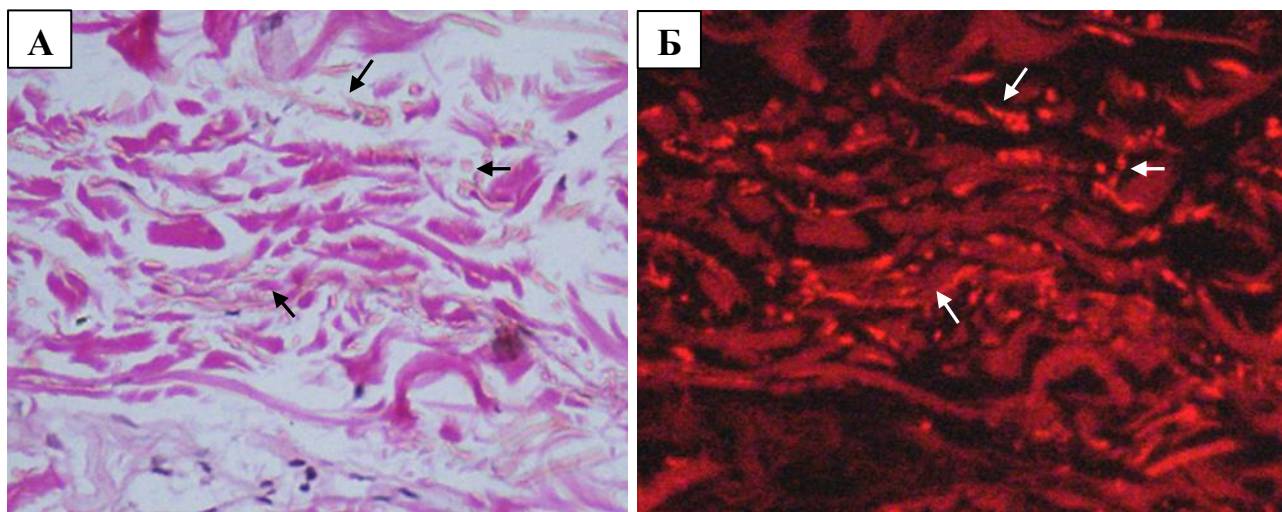


Рисунок 53 – Выявление пикринофильных волокон коллагена в дерме через 3 суток эксперимента в контрольной группе. Увеличение  $\times 400$ . А – окраска по Ван-Гизону, Б – автофлуоресценция коллагеновых волокон.

В проходящем свете пикринофильные волокна (показаны стрелками) имеют бледно-желтый оттенок, при этом уровень их автофлуоресценции гораздо выше, чем у нормальных волокон.

В опытных группах повреждение межклеточных волокон дермы было выражено слабее, чем в контроле. Волокна с уровнем автофлуоресценции выше 60 фут-кандел выявлялись лишь на поверхности раны или вообще не выявлялись, число отежных волокон было также заметно меньше чем, в контрольной группе. Уровень  $MFI_{кол}$  в опытных группах был сходным, составляя  $39 \pm 4$  фут-кандел, и достоверно не отличался от аналогичных значений в

здоровой дерме ( $p > 0,05$ ). При использовании повязок с нестабилизированными тромбоцитами плотность инфильтрации клетками составляла в среднем  $37 \pm 3$  клеток/ $\text{мм}^2$ , повязок со стабилизированными тромбоцитами –  $40 \pm 3$  клеток/ $\text{мм}^2$ . Таким образом, при использовании повязок с тромбоцитами плотность инфильтрации была в 3-4 раза ниже, чем в контроле. В обеих группах наблюдался рост краевого эпителия, а также очень активная миграция эпителиальных клеток из волосяных фолликулов (рис. 54).

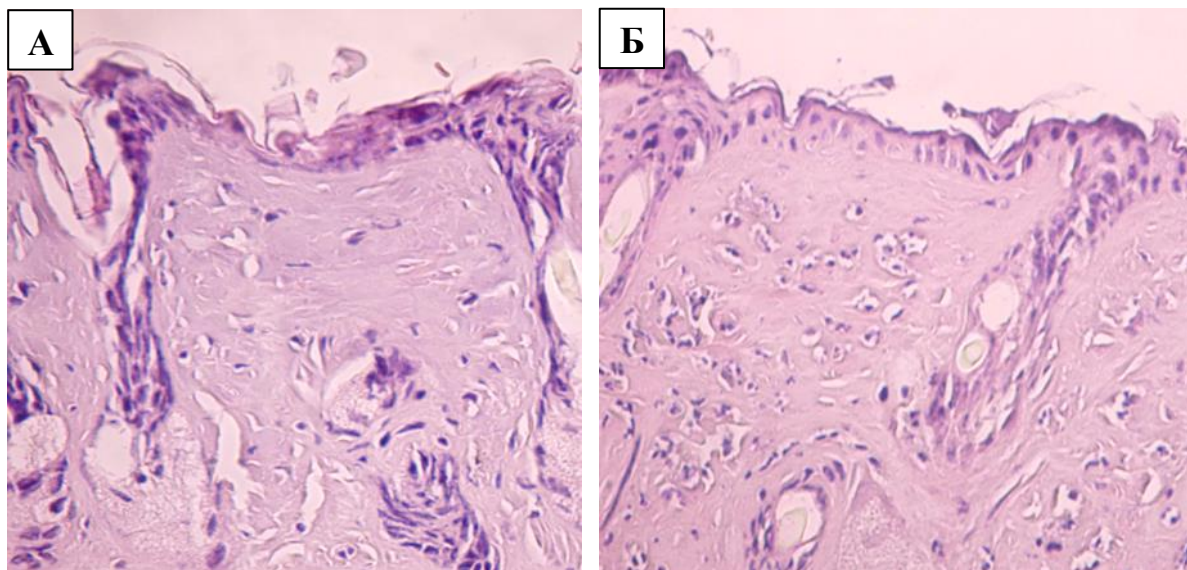


Рисунок 54 – Рост эпителия на поверхности экспериментальной ожоговой раны через 3 суток лечения коллагеновой повязкой с нестабилизированными (А) и стабилизированными тромбоцитами (Б). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ .

Активная миграция клеток также наблюдалась в подлежащих слоях раны, причем в группе лечения повязкой с нестабилизированными тромбоцитами этот процесс был более интенсивным, чем при использовании стабилизированных тромбоцитов (рис. 55). У животных с наиболее интенсивной миграцией клеток фибробласты выстраивались в виде направленных тесных цепочек (рис. 55А). Таковую картину можно было видеть у животных 2 группы. У животных 3 группы (повязки со стабилизированными тромбоцитами) миграция фибробластов чаще всего не была такой направленной (рис. 55Б). В обеих опытных группах многие фибробласты имели ядра со слабо компактизированным хроматином (признак активных ядер). Инфильтрация подлежащих слоев раны клетками воспаления

была диффузной и слабовыраженной. Таким образом, через 3 суток в опытных группах репаративные процессы были выражены сильнее по сравнению с контролем, при этом стоит признать, что интенсивность репарации различалась у разных животных.

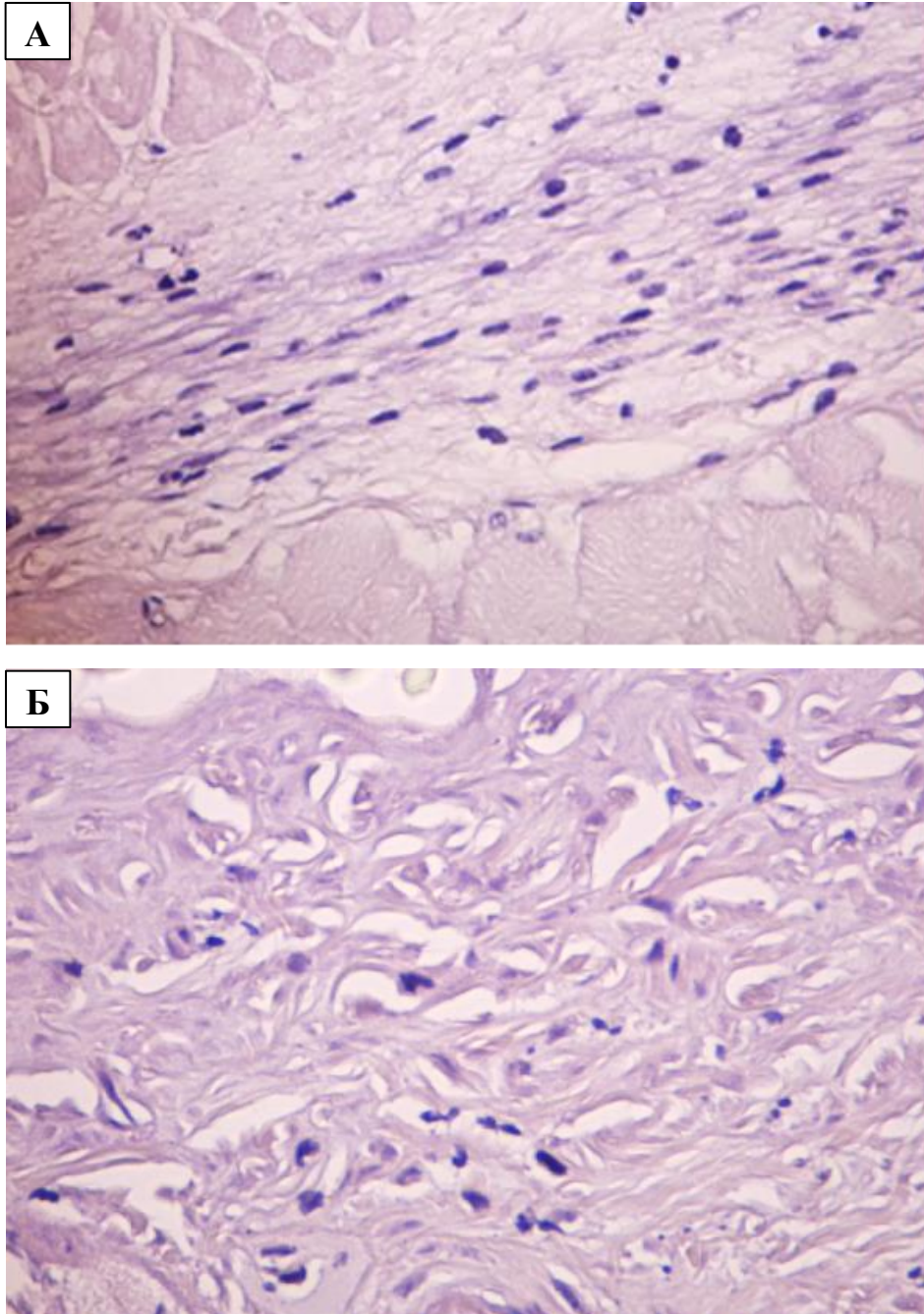


Рисунок 55 – Миграционная активность клеток в ране через 3 суток эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x400. А – миграция фибробластов в подлежащих тканях при лечении повязкой с нестабилизированными тромбоцитами; Б – миграция фибробластов в область дермы при лечении повязкой со стабилизированными тромбоцитами.

Через 5 суток отмечали полное в опытных группах и частичное в контрольной группе восстановление эпителиального покрова. В эпителизованных участках наблюдался диффузный рост волос (рис. 56).

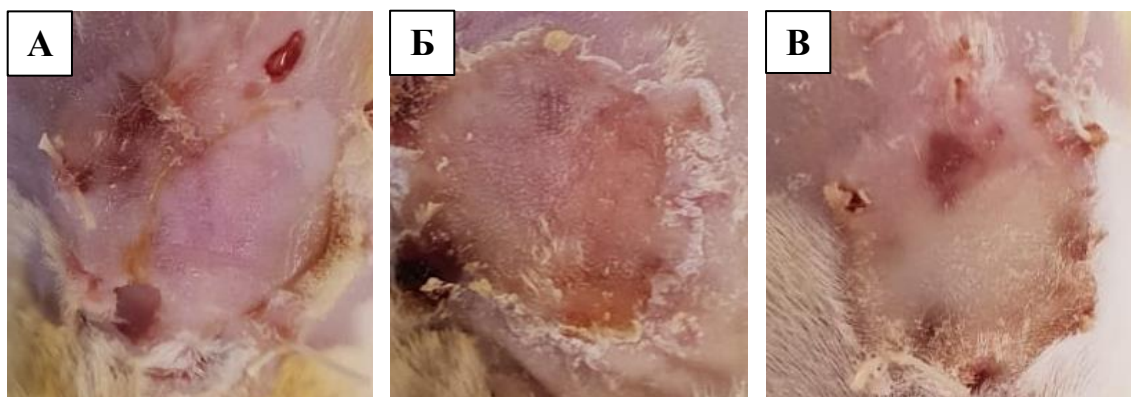


Рисунок 56 – Макрокартина экспериментальной ожоговой раны через 5 суток лечения коллагеновой повязкой без тромбоцитов (А), с нестабилизированными (Б) и стабилизированными тромбоцитами (В).

Во всех группах уровень  $MFI_{кол}$  достоверно не отличался от аналогичных значений в здоровой дерме ( $p > 0,05$ ), пикринофильные волокна практически не выявлялись. Вместе с тем, в контрольной группе в глубоких слоях дермы волокна сохраняли отечность. Наиболее интенсивная инфильтрация клетками воспаления наблюдалась в подлежащих слоях раны – плотность инфильтрации в этих областях составляла  $108 \pm 14$  клеток/ $мм^2$  и достоверно не отличалась от аналогичных значений на 3 сутки. В области дна плотность инфильтрации клетками воспаления составила  $64 \pm 9$  клеток/ $мм^2$  и была ниже, чем на 3 сутки ( $p < 0,05$ ). Эпителизованная область раны была покрыта однослойным неэпителием, зоны формирования многослойного эпителия были незначительными (рис. 57А).

В опытных группах эпителий на всех участках содержал не меньше 2-3 слоев клеток, продолжалась активная миграция эпителия из придатков кожи, отмечено интенсивное формирование дериватов кожи, формирование многослойного эпителия (рис. 57Б,В). Вместе с тем, в ряде участков наблюдалось отделение эпителиального слоя от дермы.

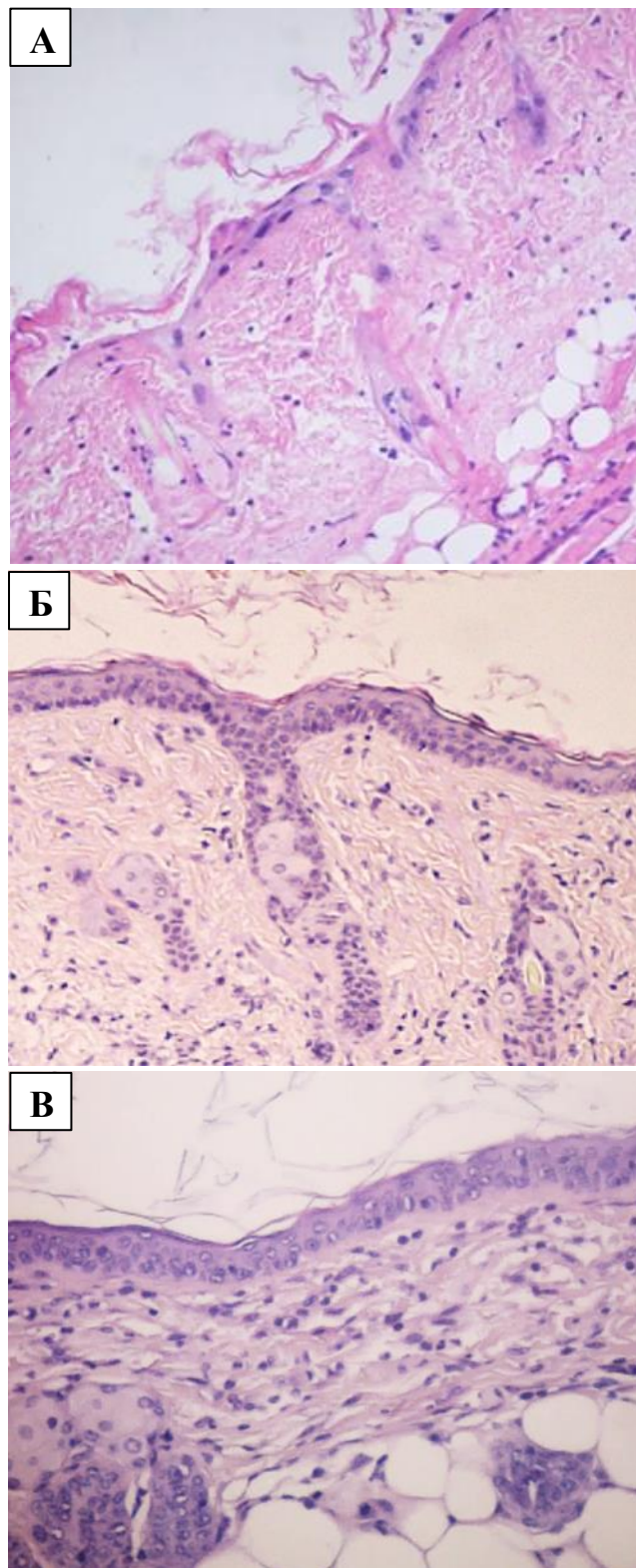


Рисунок 57 – Восстановление эпителия в экспериментальной ожоговой ране через 5 суток лечения коллагеновой повязкой без тромбоцитов (А), повязкой с нестабилизированными (Б) и стабилизированными (В) тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200.

Инфильтрация клетками воспаления была неравномерной – у животных обеих групп можно было выявить участки, целиком свободные от клеток воспаления и участки с небольшими очагами воспаления. Во 2 группе (повязки с нестабилизированными тромбоцитами) плотность инфильтрации клетками составляла в среднем  $30 \pm 2$  клеток/ $\text{мм}^2$ , в 3 группе –  $35 \pm 2$  клеток/ $\text{мм}^2$ , т.е. наблюдалось снижение инфильтрации по сравнению с 3 сутками ( $p < 0,05$ ), однако это снижение не было значительным. Как и на 3 сутки, воспалительный инфильтрат имел смешанный клеточный состав. В обеих группах в дерме отмечалась высокая миграционная активность фибробластов.

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.

### **8.5.2 Лечение глубокой механической раны**

Лечение глубокой механической раны проводили с использованием дермального матрикса (ДМ). В контрольной группе сформированную рану укрывали дермальным матриксом без тромбоцитов, в опытных группах использовали дермальный матрикс, насыщенный интактными (нестабилизированными) тромбоцитами и тромбоцитами, предварительно инкубированными с 2,5 мкМ наносеребра. Результаты лечения оценивали на 3, 14 и 21 сутки после нанесения раны.

Через 3 суток у всех животных наблюдалась выраженная гиперемия и отечность раны (рис. 58). У всех животных опытной группы марлевый тампон отделялся с трудом. В группе лечения ДМ со стабилизированными тромбоцитами у 4 животных из 5 отмечена интенсивная экссудация с пропитыванием тампона, что затрудняло его отделение. В группе лечения ДМ с нестабилизированными тромбоцитами у 2 животных выявлен гнойный инфильтрат. Дермальный матрикс был плотно зафиксирован к дну раны у всех животных.



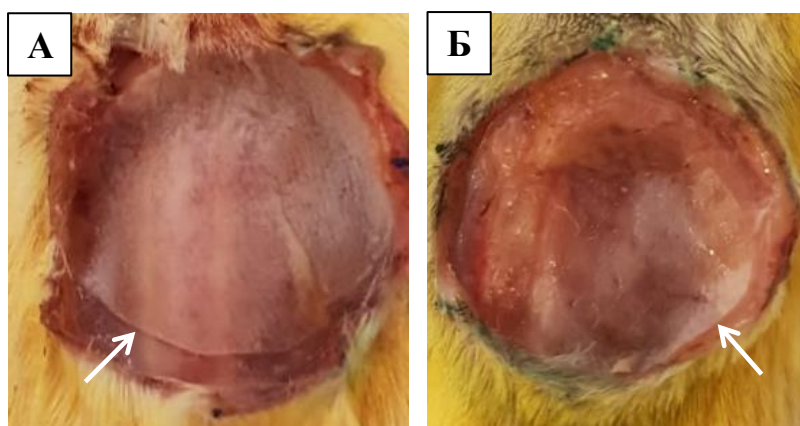


Рисунок 58 – Макрокартина экспериментальной глубокой раны через 3 суток лечения дермальным матриксом с нестабилизированными (А) и стабилизированными тромбоцитами (Б). Стрелкой показан край дермального матрикса.

При гистологическом исследовании через 3 суток у всех животных контрольной и опытных групп на всей поверхности раны полностью отсутствовал эпителий и дермальный слой (рис. 59). У всех животных наблюдалось формирование обширного струпа, включавшего раневое отделяемое и дермальный матрикс, тесно ассоциированного с тканями дна раны. Во всех случаях дно раны и подлежащие ткани были сильно инфильтрированы клетками воспаления – в контрольной группе плотность инфильтрации составила  $266 \pm 12$  клеток/ $\text{мм}^2$ , в опытных группах –  $230 \pm 15$  клеток/ $\text{мм}^2$  ( $p < 0,05$ ). В контрольной группе инфильтрат состоял преимущественно из сегментоядерных гранулоцитов, в опытных группах состав инфильтрата был смешанным и включал макрофаги, гранулоциты и незначительное число лимфоцитов. У животных обеих опытных групп по краям раны наблюдалась активный рост дериватов кожи. В составе растущих дериватов были отчетливо видны скопления округлые скопления крупных ярко окрашенных базофильных клеток (рис. 60).

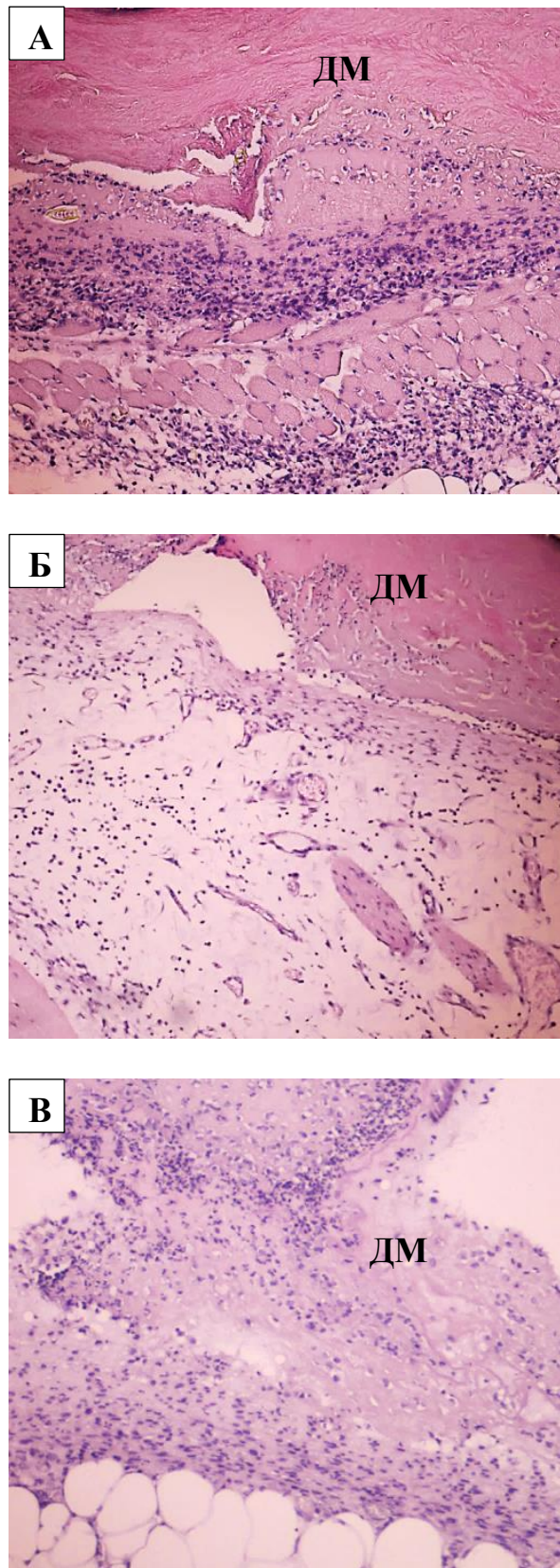


Рисунок 59 – Дно экспериментальной глубокой раны через 3 суток лечения ДМ без тромбоцитов (А), ДМ с нестабилизированными тромбоцитами (Б), ДМ со стабилизированными тромбоцитами (В). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ . условные обозначения: ДМ – дермальный матрикс.

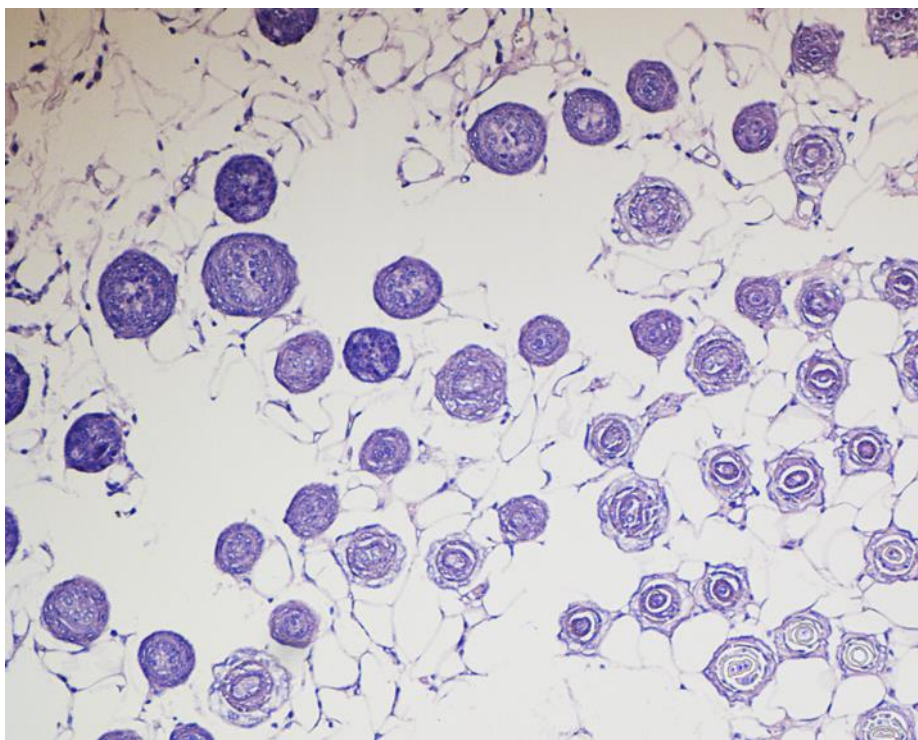


Рисунок 60 – Рост дериватов кожи края глубокой раны через 3 сутки при лечении дермальным матриксом с нестабилизированными тромбоцитами.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100.

У всех животных экспериментальных групп в подлежащих слоях раны отмечена интенсивная миграция клеток (рис. 61), среди которых можно было выявить и фибробласты со слабопигментированным ядром (рис. 61В). В контроле подобная активная миграция фибробластов в подлежащих слоях раны не была отмечена. В обеих группах отмечалась выраженная отёчность волокон подлежащих тканей и полнокровие сосудов.

Таким образом, через 3 суток лечения трансплантаты с тромбоцитами стимулировали миграцию в область раны функционально активных клеток, процесс был более выраженным при использовании ДМ с нестабилизированными тромбоцитами.

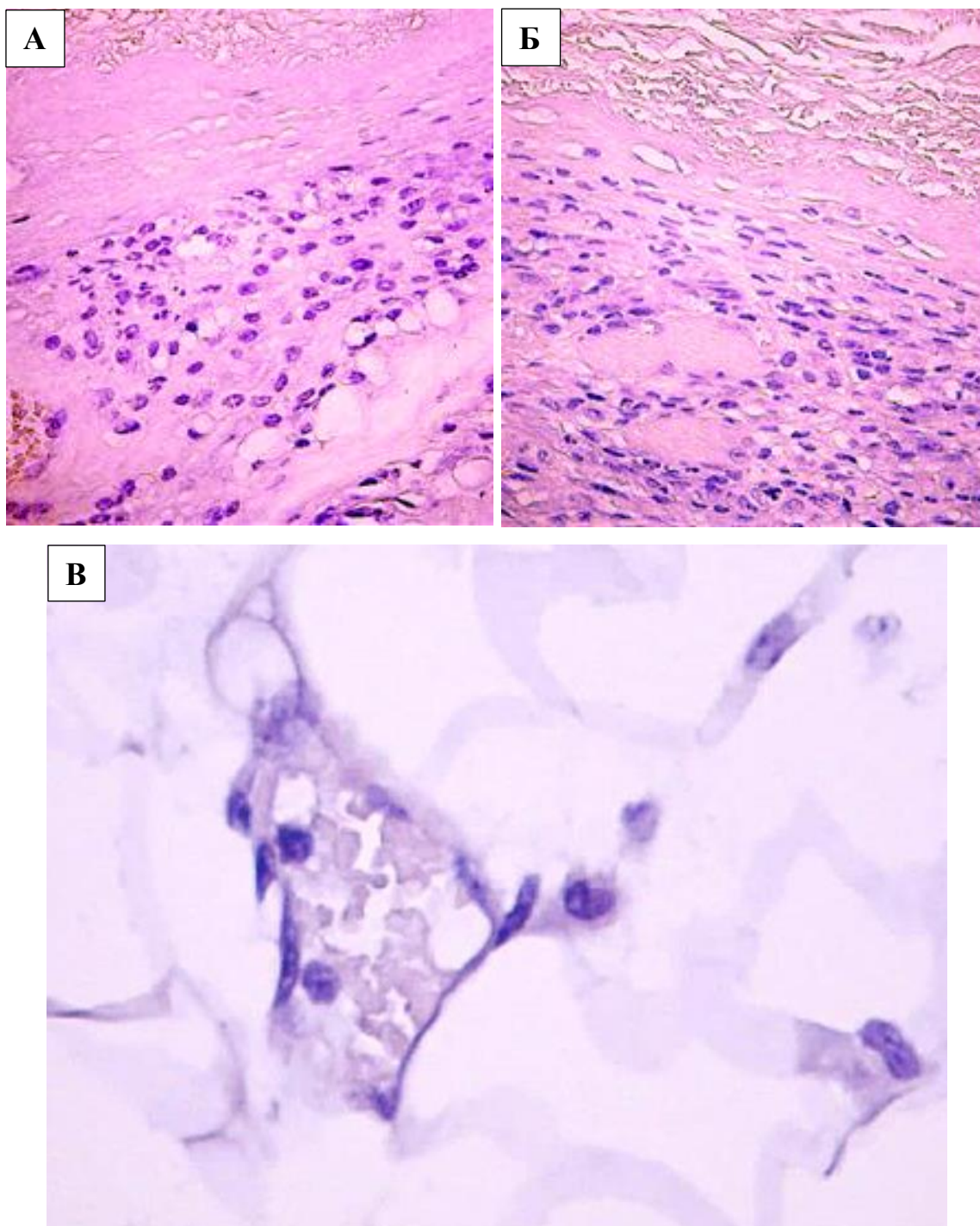


Рисунок 61 – Миграция клеток в подлежащих тканях экспериментальной глубокой раны в группе лечения дермальным матриксом с нестабилизированными (А) и стабилизированными (Б, В) тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином.

А, Б – увеличение x400, В – увеличение x 800.

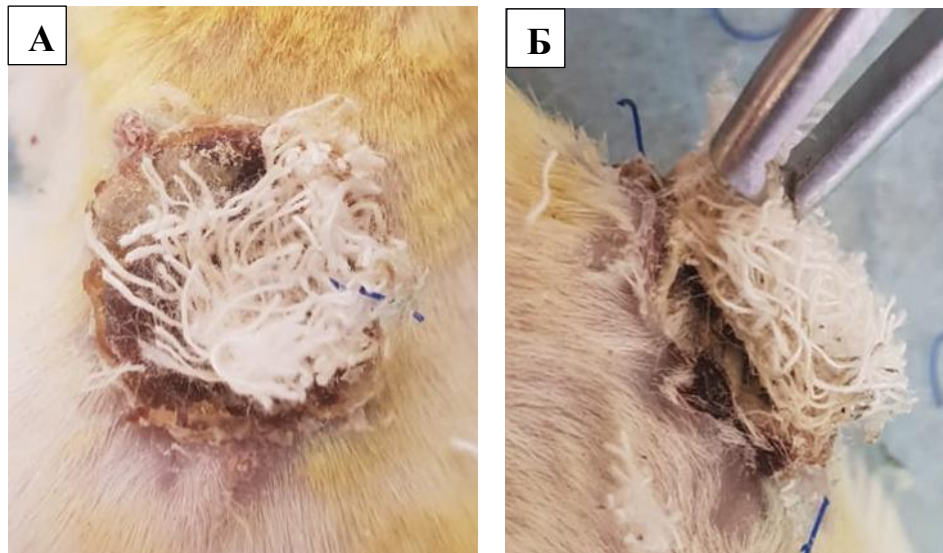


Рисунок 62 – Макрокартина экспериментальной глубокой раны через 14 суток лечения дермальным матриксом с нестабилизированными (А) и стабилизированными тромбоцитами (Б).

Через 14 суток у всех животных опытных групп наблюдалась гиперемия и отечность раны (рис. 62). Марлевый тампон был тесно связан с дермальным матриксом и отделялся с большим трудом от дна раны вместе с ним. Экссудативное отделимое отмечено у 3 животных из 5 в группе лечения дермальным матриксом с нестабилизированными тромбоцитами и у всех животных в группе лечения дермальным матриксом со стабилизированными тромбоцитами. У всех животных рост волос в области раны отсутствовал. При гистологическом исследовании в контроле и в опыте отмечено формирование грануляционной ткани по всему дну раны (рис. 63), у 3 животных из обеих опытных групп отмечался очень интенсивный рост краевого эпителия (рис. 64). У этих же экспериментальных животных значительные участки раны были свободны от струпа, однако полного очищения раны от струпа не происходило. Плотность новообразованных сосудов в контроле составила  $171 \pm 33$ , в опытных группах  $504 \pm 27$  ( $p < 0,05$ ), т.е. была увеличена почти в 3 раза. При этом во всех группах 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.

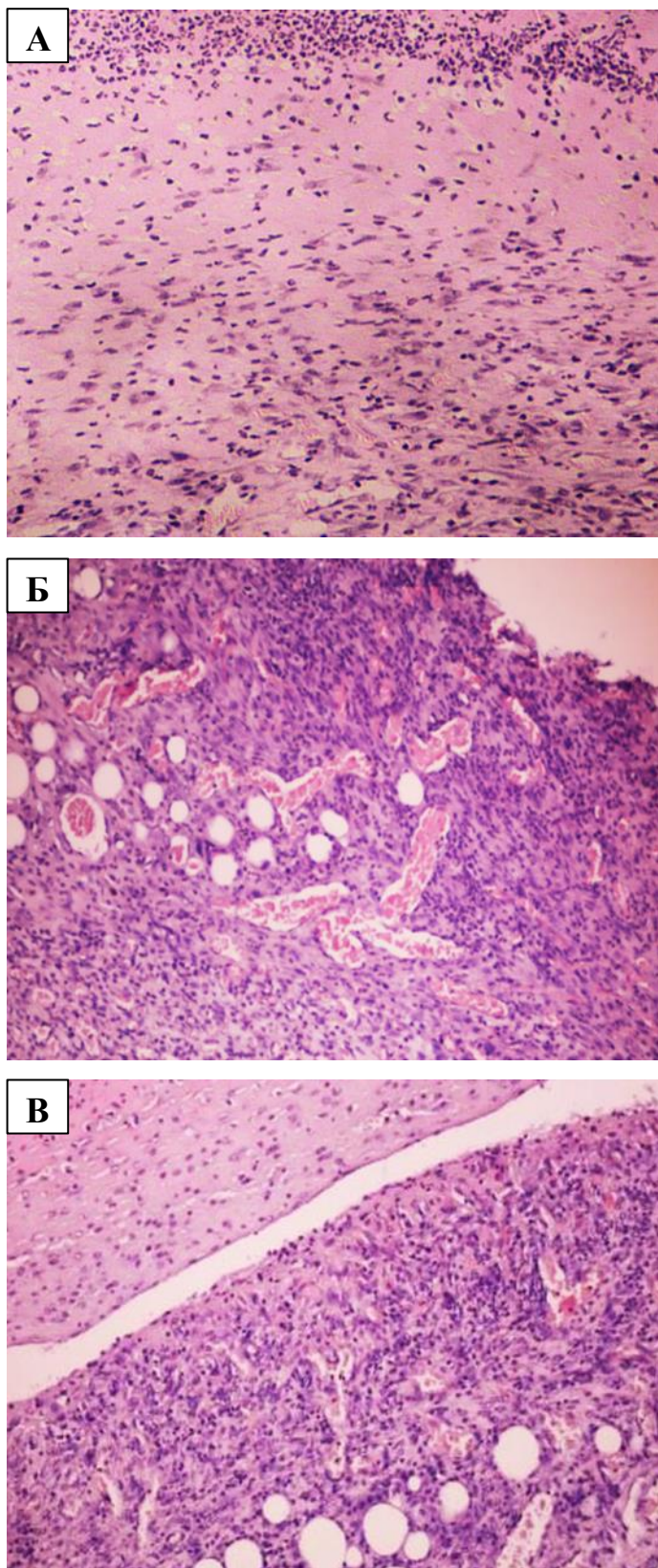


Рисунок 63 – Рост грануляционной ткани в ране через 14 суток лечения дермальным матриксом без тромбоцитов (А), дермальным матриксом, насыщенным нестабилизированными (Б) или стабилизированными (В) тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x200.

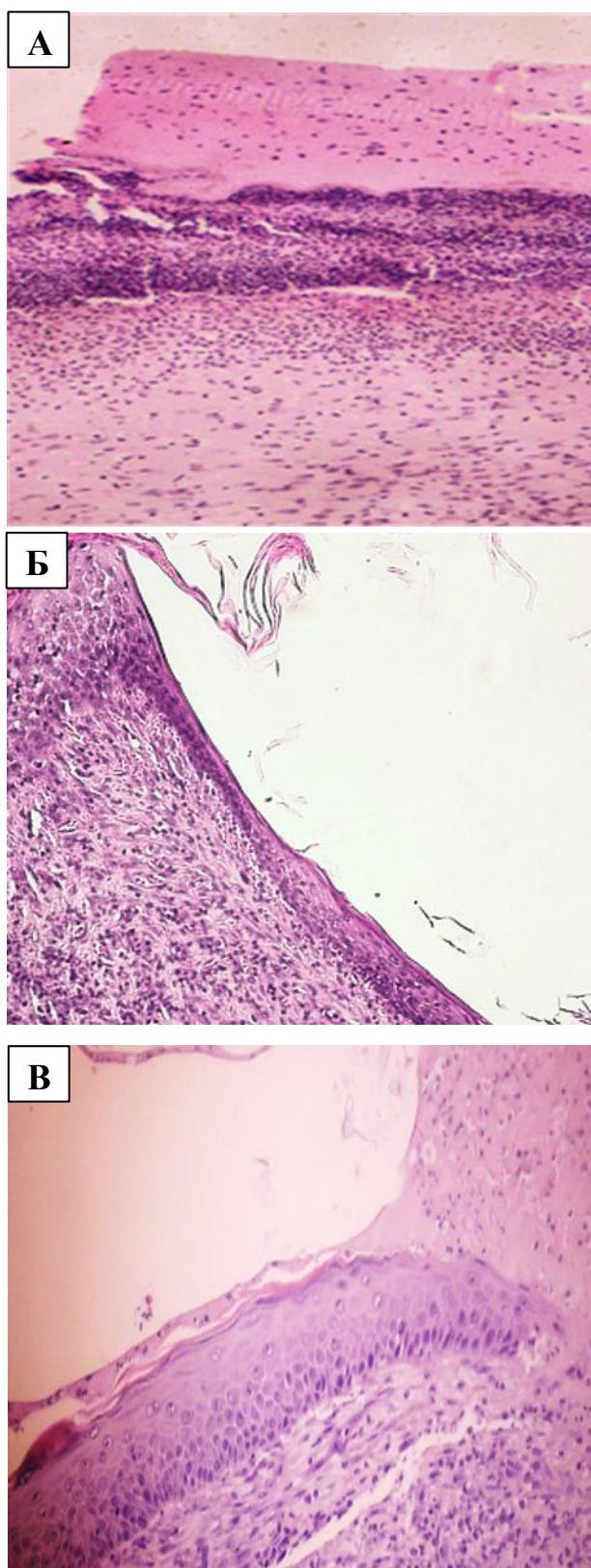


Рисунок 64 – Эпителизация глубокой раны через 14 суток лечения дермальным матриксом без тромбоцитов (А), дермальным матриксом, насыщенным нестабилизированными (Б) или стабилизированными (В) тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100.

Волокна с  $MFI_{кол}$  выше 60 фут-кандел отсутствовали в обеих группах, в группе лечения ДМ со стабилизированными тромбоцитами число отечных волокон было несколько выше, чем при лечении нестабилизированными тромбоцитами, однако это не влияло на средний уровень  $MFI_{кол}$ . В целом, в обеих группах коллагеновые волокна были недостаточно компактизированными, уровень  $MFI_{кол}$  волокон был достоверно ниже нормы и составлял  $26 \pm 2$  фут-кандел, что говорит об их незрелости. Можно заключить, что в присутствии тромбоцитов в составе ДМ через 14 суток лечение наблюдалась стимуляция ангиогенеза в области раны, а также усиление других репаративных процессов на фоне сохранения выраженной воспалительной реакции.

На 21 сутки у животных контрольной группы раневое покрытие было тесно связано со струпом в местах его формирования, выявлялись эпителизированные участки. В опытных группах практически вся поверхность раны была эпителизирована, область струпа не выявлялась или была незначительной (рис. 65). Во всех группах по краям раны отмечен интенсивный рост волосяного покрова.

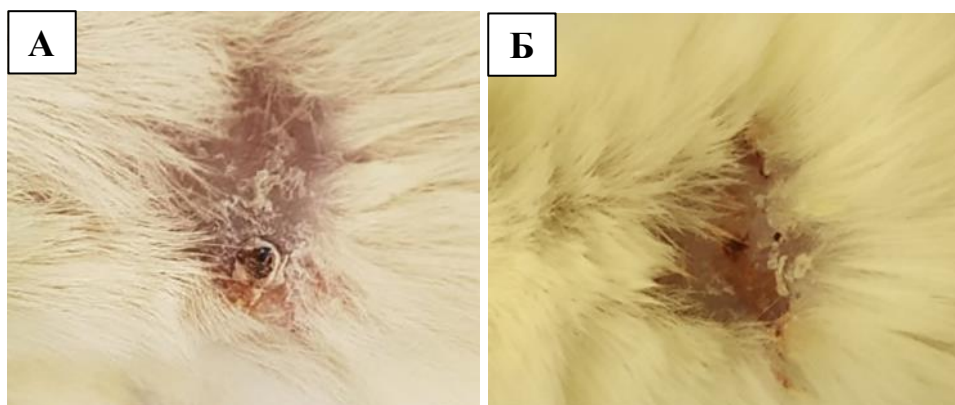


Рисунок 65 – Макрокартина экспериментальной глубокой раны через 21 сутки лечения коллагеновой повязкой с нестабилизированными (А) и стабилизированными тромбоцитами (Б).

При гистологическом исследовании в контроле выявлялись обширные области, покрытые эпителием, однако эпителизация не была полной. В областях, связанных со струпом, отмечен высокий уровень инфильтрации клетками воспаления, восстановления дериватов кожи в этих участках не наблюдалось



(рис. 66). Плотность инфильтрации клетками воспаления составляла  $203 \pm 25$  клеток/ $\text{мм}^2$  и была ниже, чем на 3-14 сутки ( $p < 0,05$ ). С другой стороны, в областях, связанных со струпом, число новообразованных сосудов было таким же, как на 14 сутки ( $p < 0,05$ ).

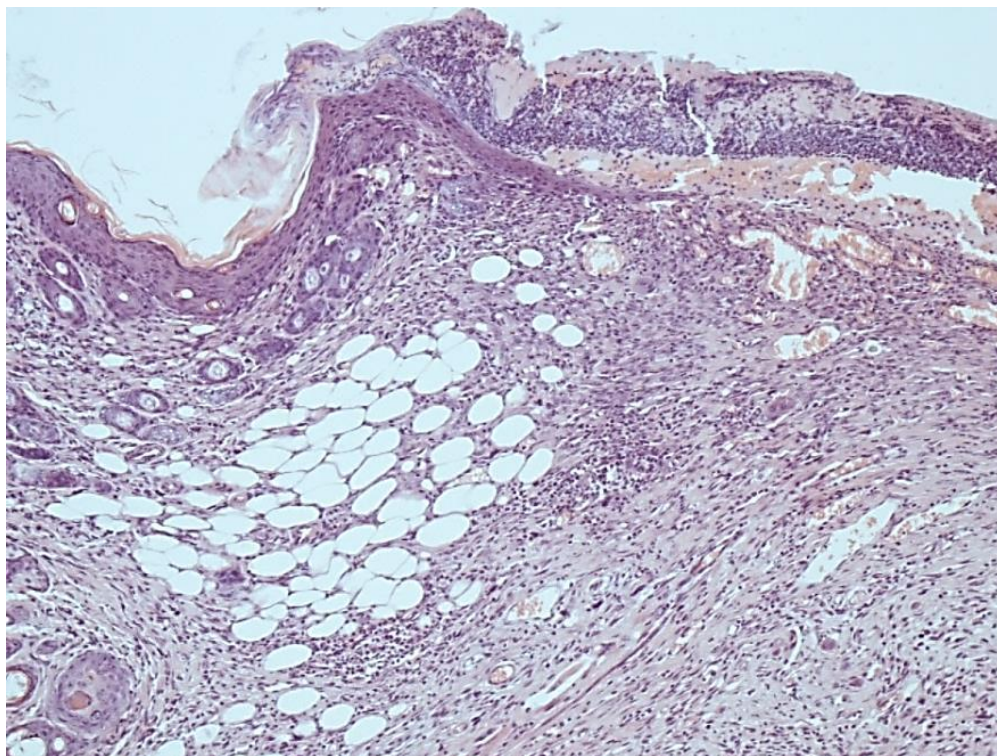


Рисунок 66 – Дно глубокой раны через 21 сутки лечения дермальным матриксом без тромбоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ .

В обеих опытных группах вся область раны была покрыта эпителием на всем протяжении, наблюдалось формирование многослойного эпителиального пласта (рис. 67) и отделение струпа. На дне раны и по краям раны наблюдался очень интенсивный рост дериватов кожи, отмечена активная пролиферация клеток в их составе (рис. 68). В группе лечения ДМ с нестабилизированными тромбоцитами плотность инфильтрации клетками воспаления составляла в среднем  $136 \pm 3$  клеток/ $\text{мм}^2$ , ДМ со стабилизированными тромбоцитами –  $153 \pm 6$  клеток/ $\text{мм}^2$  и была достоверно ниже, чем на 3-14 сутки ( $p < 0,05$ ).

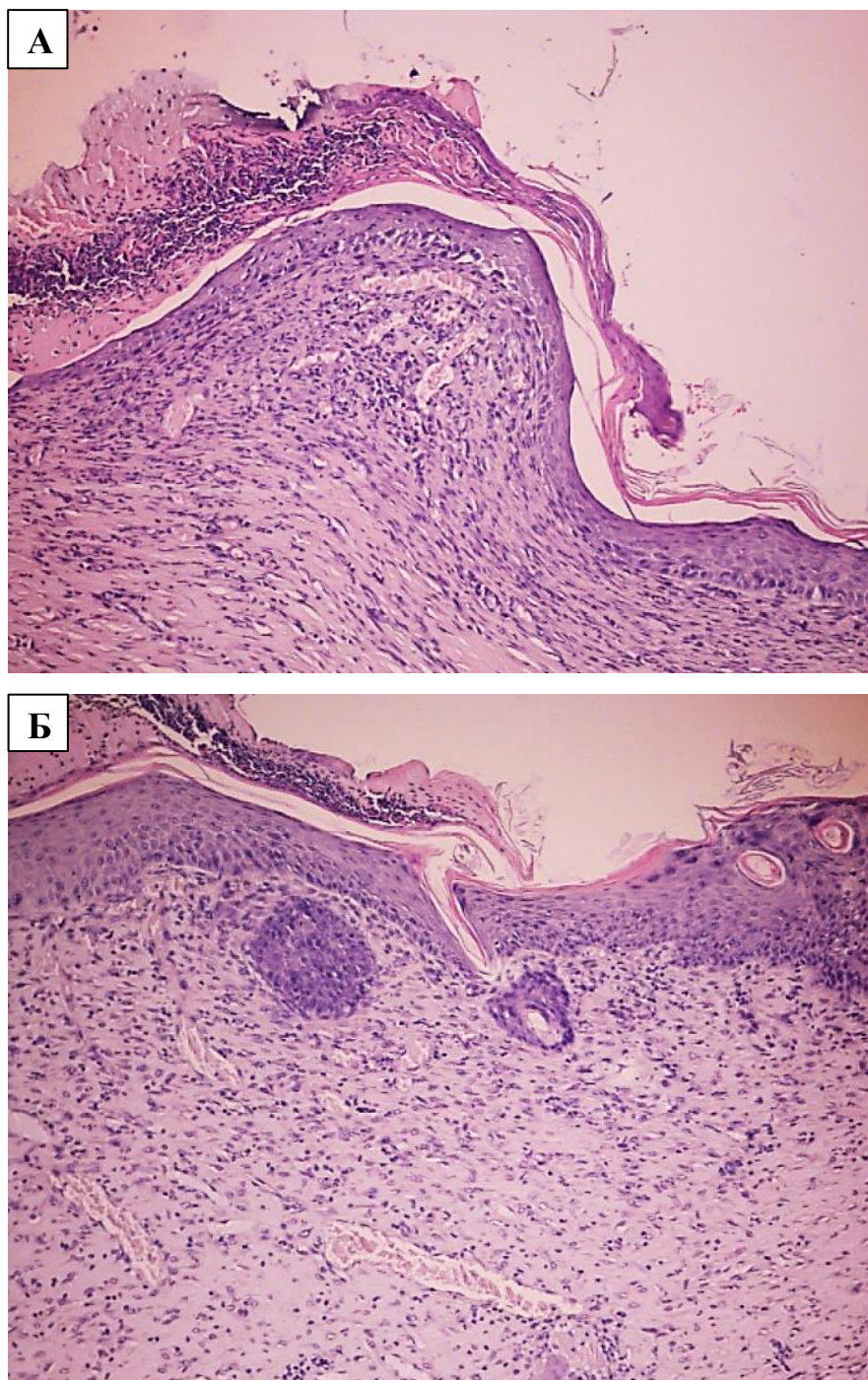


Рисунок 67 – Дно экспериментальной глубокой раны через 21 сутки лечения дермальным матриксом с нестабилизированными (А) и стабилизированными (Б) тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x100.

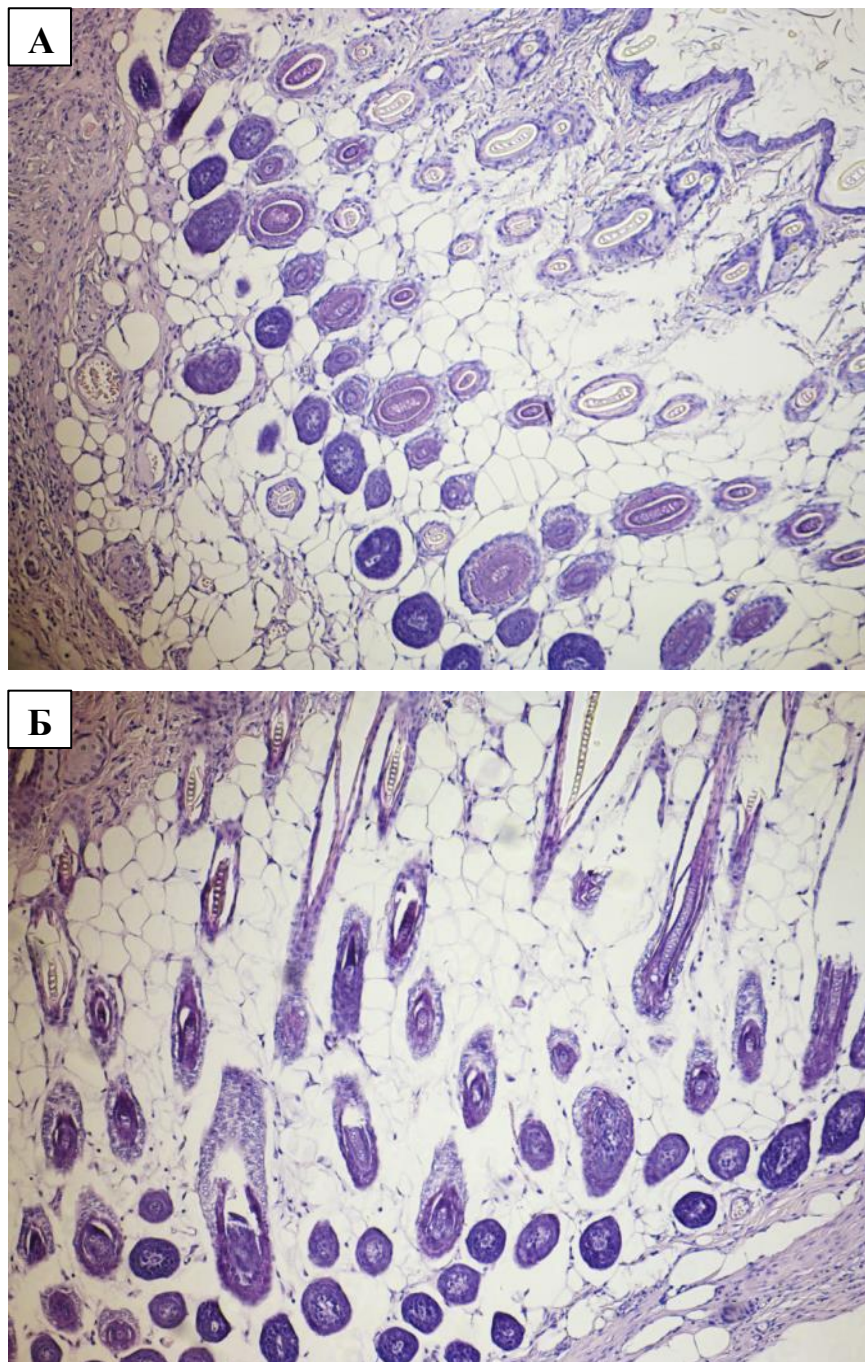


Рисунок 68 – Рост дериватов кожи на дне раны через 21 сутки лечения дермальным матриксом с нестабилизированными (А) и стабилизированными (Б) тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 100$ .

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. В обеих группах в области раны наблюдалось большое количество фибробластов со слабо пигментированным хроматином. Часть коллагеновых волокон имела близкий к нормальному уровень  $MFI_{кол}$  (32-34 фут-кандел), однако у большинства волокон уровень  $MFI_{кол}$  варьировал от 25 до 31 фут-кандел, рисунок распределения коллагеновых волокон также отличался от нормальной топографии коллагена дермы, средний уровень  $MFI_{кол}$  составил  $28 \pm 3$  фут-кандел, т.е. был достоверно снижен по сравнению с нормальными волокнами ( $p < 0,05$ ). Таким образом, полного восстановления дермы через 21 сутки в опытных группах не происходило на фоне сохранения воспалительной реакции. С другой стороны, у обследованных животных наблюдалась характерная стадия ремоделирования раны, в опытных группах ремоделирование тканей в области раны шло более интенсивно по сравнению с контролем.

Можно заключить, что раневые покрытия на основе ДМ с тромбоцитами ускоряли миграцию клеток в ране, стимулировали рост эпителия и грануляционной ткани, стимулировали ремоделирование кожи. При этом выбранные концентрации тромбоцитов с гранулами не обладали выраженным противовоспалительным действием. На 3-14 сутки интенсивность репаративных процессов в группе лечения ДМ с нестабилизированными тромбоцитами была несколько более выраженной, однако через 21 сутки репаративный эффект был схожим в обеих опытных группах. Для более точного сравнения эффекта стабилизированных и нестабилизированных тромбоцитов при лечении ран необходимо исследовать действие препаратов с разным содержанием тромбоцитов, а также препаратов, приготовленных из аллогенной и аутологичной БотП. В целом, уже сейчас можно сказать, что насыщенные тромбоцитами коллагеновые матрицы могут быть весьма эффективными при лечении обширных ран.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время тромбоциты являются объектом активного исследования как в биологии, так и в различных областях медицины, в первую очередь, связанных со стимуляцией в тканях репаративных и регенеративных процессов. Многообразие биологических реакций, непосредственными участниками которых являются тромбоциты, во многом обусловлены наличием в этих клетках большого количества регуляторных пептидов, локализованных в гранулах. При этом разные пути активации тромбоцитов реализуют различные эффекты, как положительные, так и отрицательные, что заметно усложняет выбор адекватного подхода к использованию тромбоцитарного материала в практических целях. Наиболее часто в клинической практике тромбоцитарные компоненты используются в виде богатой тромбоцитами плазмы (БотП) или лизата, полученного путем криодеструкции тромбоцитов. Процедура заготовки БотП до сих пор не является стандартизированной. Принято считать, что для эффективной стимуляции репаративных процессов БотП должна содержать не менее 1000 тыс клеток на 1 мл, однако при этом не учитывается структурная целостность и функциональная активность тромбоцитов. Неоднократно показано, что БотП с высокой концентрацией клеток может быть малоэффективной, и более того, может препятствовать репарации тканей [124, 156, 169, 201]. С другой стороны, есть данные, что репаративным эффектом обладает плазма, небогатая тромбоцитами, а также плазма, бедная тромбоцитами [30, 158, 221, 269]. При этом необходимо учитывать, что в крови каждого человека популяция тромбоцитов обладает выраженной гетерогенностью, и не все клетки в ее составе являются биологически полноценными. Более того, функциональная активность тромбоцитов может заметно варьировать как у пациентов, так и у здоровых людей. В связи с этим для использования тромбоцитов или их компонентов в клинической практике большое значение имеет оценка качества этих клеток. В подавляющем большинстве работ, где описывается клиническое использование тромбоцитов,

оценка тромбоцитов ограничивается только подсчетом их общего числа в БотП, без учета их морфофункциональных характеристик. Проведенное исследование показало, что морфофункциональные параметры играют критическую роль еще на этапе обследования исходного тромбоцитарного материала. Было установлено, что во всех гендерно-возрастных группах у здоровых людей наблюдается высокая вариабельность морфофункционального статуса тромбоцитов. В обеих гендерных группах выявлена субпопуляция с повышенной чувствительностью тромбоцитов к низким дозам АДФ. Кроме того, морфофункциональный анализ позволил выявить среди тромбоцитов с гранулами субпопуляцию клеток, склонных к очень быстрой дегрануляции при контакте с адгезивным субстратом. Доля таких клеток могла заметно отличаться, что также указывает на высокое различие в реактивности тромбоцитарного звена у разных людей. Показано, что адгезивная активность тромбоцитов у здоровых людей зависит от плотности рецепторов адгезии, наличия полиморфизмов рецепторных белков  $\alpha 2\beta 1$ - и  $\alpha 2\beta 3$ , других характеристик, выявляемых в процессе клиничко-лабораторного исследования [23, 81, 157]. Проведенная работа показала, что морфофункциональный анализ также позволяет выявлять тромбоциты, склонные к быстрой и спонтанной активации. При этом неизвестно, есть ли связь между повышенной чувствительностью тромбоцитов к индукторам активации и высокой скоростью роста ламеллы. Есть данные, что дегрануляция и рост ламеллы в тромбоцитах не могут быть инициированы одновременно [112, 191]; это может объяснить эффект, при котором тромбоциты с большой ламеллой дегранулируют дольше, чем тромбоциты без ламеллы. У пациентов, принимающих препараты-блокаторы рецепторов активации, тромбоциты слабо адгезируют на стекле и рост ламеллы заметно снижен [41]. С другой стороны, подавление роста ламеллы не исключает вероятности быстрой дегрануляции тромбоцитов, с учетом того, что тромбоциты могут быть активированы многими способами. Выявление рисков спонтанной активации тромбоцитов в настоящее время стоит весьма остро [28, 29, 81]. Существуют инструментальные подходы к решению этой проблемы, при этом известные методики часто не позволяют

охарактеризовать морфофункциональный статус тромбоцитов. Мониторинг интенсивности роста ламеллы может дать дополнительную информацию о склонности тромбоцитов к спонтанной активации с учетом их морфофункциональных свойств.

В данной работе использован термин «неканонические способы активации тромбоцитов» для обозначения веществ или факторов, вызывающих активацию тромбоцитов без прямого использования индукторов адгезии или агрегации. Спектр известных веществ, способных вызывать спонтанную активацию тромбоцитов, весьма широк и, по-видимому, продолжит увеличиваться. Можно выделить ряд параметров, по которым можно прогнозировать способность фактора к активации тромбоцитов: резкое увеличение проницаемости их мембран (в первую очередь, это вызывает выход ионов кальция из внутриклеточных депо и запуск каскада активации); наличие стабильного положительного электростатического заряда (характерно для ряда наночастиц и матриксов); изменение физико-химических свойств среды внутри тромбоцита и за его пределами. Многие неканонические факторы могут сочетать все эти свойства: так, наночастицы серебра в больших концентрациях одновременно представляют положительно заряженный субстрат, повышают проницаемость мембран, также не исключено их влияние на редокс-потенциал среды. Изучение неканонических способов активации позволило разработать оригинальный способ выделения тромбофибринового сгустка с высоким уровнем ростовых факторов при 20-22°C. Во всех предыдущих работах ТФ при такой температуре получали только из неконсервированной крови, что имеет ряд ограничений и не так удобно, как при работе с БотП, содержащей консерванты. Получение ТФ из неконсервированной крови не требует введения каких-либо дополнительных активаторов, не создает проблем с использованием стерильных реагентов, и это считается основным преимуществом методики [163]. Вместе с тем, стандартные методы получения тромбоцитарного геля из неконсервированной крови не позволяют оценивать качество тромбоцитов в ее составе, кроме того, затруднено разделение такого препарата на более мелкие дозы. Проведенное нами

исследование показало, что существует возможность получать БоТП из неконсервированной крови без немедленной полимеризации фибрина и активации тромбоцитов. При температуре от +8 до +12°C скорость фибринообразования в плазме без консервантов заметно увеличивается и одновременно уменьшается скорость дегрануляции тромбоцитов. Это позволяет аликвотировать полученную плазму с тромбоцитами, позволяет проводить их морфофункциональный анализ. Необходимо признать, что не всегда в практики ЛПУ есть возможность быстрого охлаждения и экспозиции крови до +8/+12°C. Кроме того, низкоположительные температуры позволяют отсрочить процесс активации, но не управлять им. Поэтому работа с БоТП, содержащей консерванты, дает гораздо более широкий спектр возможностей в работе с тромбоцитными препаратами.

Разные способы неканонической активации тромбоцитов позволяют использовать биологическую активность тромбоцитов в разных формах. Например, в комбинации с трансдермальным переносчиком ДМСО тромбоцитарные компоненты могут быть введены в организм без использования инъекций. В настоящее время ДМСО активно используется в ревматологии в качестве транспортера лекарственных средств. Использование комбинации ДМСО и БоТП представляется весьма перспективным для лечения ревматических заболеваний, требующих восстановления исходной структуры тканей, а также стимуляции ангиогенеза. В зависимости от поставленных задач и особенностей клинического процесса можно выбирать разные подходы к неканонической активации тромбоцитов.

Стоит особенно отметить способность тромбоцитов к активации под действием низкоимпульсного лазерного света. Такой способ активации является неинвазивным и потенциально может иметь широкое применение, как для запуска дегрануляции тромбоцитов, так и для повышения их адгезивных свойств. Работы по исследованию действия лазерного света на биологические объекты ведутся уже много десятилетий [52, 47], однако до сих пор не



проводилось подробного морфофункционального исследования тромбоцитов после облучения НИЛИ разных волн. Полученные в этой работе данные позволяют точно сказать, что при воздействии видимого ультрафиолетового или красного света в течение 5 мин и дольше происходит активация и дегрануляция тромбоцитов. В литературе описано влияние НИЛИ в красном диапазоне на открытие внутриклеточных кальциевых каналов [199], которое является мощным триггером активации биологически полноценных тромбоцитов. Описанный в литературе эффект снижения агрегационной активности после облучения красным светом, скорей всего, связан со снижением числа тромбоцитов с гранулами в результате облучения и с потерей части пула биологически активных тромбоцитов, что в конечном итоге влияло на агрегационную активность в целом. В настоящее время УФ-облучение тромбоцитов используется в приборах системы Adi-Light, которые позволяют получать фотоактивированную богатую тромбоцитами плазму. Показано, что инъекции УФ-активированных тромбоцитов могут быть эффективными при лечении остеоартрита и других патологий коленного сустава [47, 150], однако при этом не проводится никакого контроля качества тромбоцитов. Не вызывает сомнения, что интенсивность активации всего пула тромбоцитов, его биологический и клинический эффект принципиально зависит от содержания в исходной дозе структурно и функционально полноценных клеток. В процессе работы нами было неоднократно отмечено, что после лазерного облучения при длине волны 408 нм или 637 нм в формировании тромбоцитарных агрегатов участвовали исключительно тромбоциты с гранулами. Тромбоциты, изначально не содержавшие гранул, оставались в виде отдельных дискретных клеток – хотя при действии стандартных индукторов агрегации (коллаген, высокие дозы АДФ) наблюдается пассивное вовлечение тромбоцитов без гранул в образование агрегата. В случае воздействия НИЛИ этого процесса не наблюдалось. Можно заключить, что фотоактивация тромбоцитов связана с запуском внутриклеточных сигнальных систем, которые присутствуют только у биологически полноценных клеток. При этом под действием красного света

тромбоциты активируются заметно быстрее, чем при воздействии ультрафиолетового света. Это указывает на то, что НИЛИ красным светом также может быть использовано для фотоактивации тромбоцитов человека. С другой стороны при процедурах гемокоррекции и фотомодификации крови с помощью НИЛИ видимой части спектра возможно изменение качества тромбоцитов, особенно если используется облучение в красном или ультрафиолетовом диапазоне. Поэтому актуальной задачей является исследование морфофункциональных свойств тромбоцитов на фоне проводимых процедур лазерной терапии.

Возможность стабилизации (закрепления) гранул в адгезирующих тромбоцитах позволила взглянуть на физиологию тромбоцитов с принципиально нового угла. Тромбоциты имеют сложные системы передачи внутриклеточного сигнала, которые направлены на запуск активационных процессов. Вопрос регуляции активности тромбоцитов, с одной стороны, не является предметом пристального исследования, поскольку тромбоциты являются клетками «одноразового» действия и настоящая активация вызывает в них необратимые структурные изменения, т.е. является в буквальном смысле необратимой. С другой стороны, в тромбоцитах есть ряд систем, блокирующих спонтанную активацию тромбоцитов. К ним относятся системы, связанные с выработкой циклической АМФ, поверхностные белки, распознающие эпителиальные клетки, система антиоксидантов [78, 112, 140]. Эти системы в значительной мере направлены на поддержание гомеостаза интактных тромбоцитов и не оказывают по-настоящему интенсивной блокировки систем активации, в отличие от препаратов-антиагрегантов. Проведенные нами ранее исследования тромбоцитов под действием антиагрегантов прямого и непрямого действия показали, что предварительная обработка тромбоцитов с гранулами антиагрегантами делает адгезивной неактивными значительную часть пула биологически активных тромбоцитов [41]. В случае использования антиагрегантов прямого действия есть возможность обработки тромбоцитов уже после инициации их контакта с

адгезивным субстратом, на ранних стадиях адгезии, когда дегрануляция еще не произошла. Использование тикагрелора позволило выявить принципиальную возможность сохранения гранул в адгезирующих тромбоцитах в течение нескольких часов, даже в условиях 37°C. Также был показан дозозависимый эффект стабилизации гранул в тромбоцитах под действием тикагрелора в разных концентрациях. Это позволило расширить поиск возможных факторов стабилизации. Ранее, индийскими исследователями были получены чрезвычайно интересные сведения о роли наночастиц серебра в подавлении адгезивной активности тромбоцитов [103, 273, 274]. Проведенная работа подтвердила этот эффект и позволила подробно оценить объем гранул, сохраняющийся в тромбоцитах под действием разных доз наночастиц серебра. Было установлено, что концентрации 2,5-5 мкМ наносеребра являются весьма эффективными для стабилизации гранул в тромбоцитах, причем этот эффект может быть достигнут как путем воздействия на тромбоциты ранней стадии адгезии, так и путем предварительной инкубации БотП с наносеребром. Концентрации 2,5-5 мкМ наносеребра были нетоксичными, не нарушали целостности мембран тромбоцитов и позволяли сохранять гранулы в их составе при адгезии тромбоцитов на стекле и коллагене. Этот эффект будет очень важным для получения коллагеновых матриц, насыщенных тромбоцитами. Стоит также отметить, что разные компоненты тромбоцитарных гранул сохранялись в адгезирующих тромбоцитах при разных дозах наносеребра. Так, наибольшая сохранность VEGF наблюдалась при 1,25 мкМ наносеребра, а наибольшая сохранность EGF и PDGF – при 2,5 мкМ. К сожалению, в работе не было возможности провести иммуноцитохимическое исследование тромбоцитов, стабилизированных аскорбиновой кислотой и низкими концентрациями перекиси водорода. То, что перекись позволяет регулировать активность тромбоцитов, является интересной находкой. В литературе широко описано прокоагулянтное действие перекиси и проведенное исследование подтвердило, что перекись в высоких концентрациях вызывает массовую и необратимую активацию тромбоцитов. Однако низкие дозы перекиси (30-75 мкМ) запускают

принципиально иные механизмы регуляции активности тромбоцитов. По всей видимости, указанные концентрации перекиси блокируют перестройку -S-S-связей тромбоцитарных интегриновых белков в -SH группы, необходимую для активной адгезии тромбоцитов [111, 213]. Это может быть причиной того, что в присутствии 30-75 мкМ  $H_2O_2$  отсутствовал активный рост ламеллы адгезирующих тромбоцитов. Как известно, активное распластывание тромбоцита на субстрате запускает его дегрануляцию. С другой стороны, дегрануляция тромбоцитов может проходить и без активного роста ламеллы, особенно у лиц с повышенной реактивностью тромбоцитов. Эффект стабилизации гранул наблюдался в тромбоцитах, полученных у доноров разных гендерно-возрастных групп, что позволяет говорить о его универсальности. Эффект стабилизации тромбоцитарных гранул позволяет резко снизить потери цитокинов при производстве раневых покрытий, биоконструкций и других изделий, насыщенных тромбоцитами. В мировой литературе сохранность тромбоцитарных цитокинов предлагается достигать путем их инкорпорирования внутрь стабильных и биосовместимых матриксов [98, 126, 267], что, безусловно, является оправданным; однако, с другой стороны, инкорпорирование тромбоцитарных цитокинов требует сложной и дорогостоящей технологической базы, которая часто отсутствует в учреждениях ЛПУ. Предложенные нами методики стабилизации тромбоцитов могут быть осуществлены с помощью простого инструментария и поэтому представляются актуальными для внедрения в практическую сферу.

Стабилизация гранул в адгезирующих тромбоцитах в перспективе позволит селективно подходить к выделению их цитокинового состава. В настоящее время селективная дегрануляция тромбоцитов не используется при производстве тромбоцитных препаратов, хотя показано, что гранулы тромбоцитов обладают гетерогенностью и в процессе активации выделяются из разных компартментов [170, 244]. Выявление в циркулирующей крови дисковидных клеток с нормальной структурой цитоплазмы и малым числом

гранул позволяет предположить, что такие клетки осуществляют своего рода конститутивный (постоянный) экзоцитоз, выбрасывая небольшие объемы гранул в течение определенного времени, что не связано с необратимой активацией тромбоцитов. Показано, что у многих здоровых людей ТМч постоянно присутствуют в циркулирующей крови, что в частности, объясняет феномен выявления ростовых факторов в бесклеточной плазме, т.е. при полном отсутствии цельных тромбоцитов [160]. При различных патологиях в крови и сыворотки пациентов увеличивается уровень ТМч с определенным химическим составом [135, 160, 187]. Частично ТМч формируются благодаря экзоцитозу из мегакариоцитов [171], однако основной объем тромбоцитарных микрочастиц формируется именно благодаря активации тромбоцитов в разных формах. Тромбоциты способны к тесному контакту с форменными элементами крови, а также с другими типами клеток [194]. В условиях патологии этот контакт может многократно усиливаться, при этом во многих случаях это может вызывать не полную, а частичную дегрануляцию тромбоцитов. Если подробно оценить цитокиновый состав плазмы и сыворотки, не исключено, что при некоторых патологиях факторы репарации можно будет получать и без заготовки непосредственно БоТП, поскольку они уже находятся вне тромбоцитов [50, 51]. Нужно учитывать, что тромбоцитарные компоненты являются короткоживущими веществами, поэтому выделение их вне тромбоцитов создает дополнительные сложности. При микроскопическом исследовании эффекта стабилизации гранул необходимо иммуоцитохимическое окрашивание гранул в составе непосредственно стабилизированных тромбоцитов. В настоящей работе не было возможности провести такое исследование, поэтому она представляется весьма актуальным. Селективная дегрануляция тромбоцитов позволит получать препараты с заданным цитокиновым составом, например, с высоким содержанием ростовых факторов и низким содержанием провоспалительных факторов. Отчасти проблема селективной дегрануляции нашла отражение в данной работе. Нами были найдены концентрации наносеребра, при которой сохранность факторов роста (PDGF, EGF, VEGF, TGF- $\alpha$ ) в адгезирующих

тромбоцитах является наиболее высокой, показано, что для эффективной стабилизации гранул с VEGF и EGF требуется меньшая концентрация наносеребра (1,25 мкМ), нежели для стабилизации PDGF и TGF- $\alpha$  (2,5 мкМ). Это позволяет сохранять в тромбоцитах значительный объем PDGF без VEGF, т.е. такие препараты будут стимулировать рост клеток без стимуляции роста сосудов. Нами также установлена корреляция между PDGF и EGF, что позволяет говорить о ко-локализации этих факторов. Однако стабилизация тромбоцитов наносеребром по-разному влияет на уровень PDGF и EGF в конечном продукте. Это противоречие может быть связано, как с нестабильностью факторов и их быстрым разрушением, так и наличием тонких механизмов взаимосвязи между факторами, которые еще предстоит изучить. Анализ принципов взаимодействия тромбоцитарных факторов, безусловно, является очень важной задачей будущих исследований.

Многие тромбоцитарные компоненты обладают синергетическим действием и оказывают эффект только при совместном воздействии. В частности, известно, что для неоангиогенеза требуется широкий спектр ростовых факторов, помимо VEGF. Более того, показано, что провоспалительные интерлейкины играют важную роль в запуске начальных стадий процессов репарации в коже, в костной ткани, в хряще. Эффективное сочетание провоспалительных цитокинов и факторов роста значительно ускоряет репаративные процессы [49, 75, 271]. С другой стороны, избыток любых факторов может значительно препятствовать восстановлению тканевого дефекта. Это еще раз указывает на необходимость подбора эффективной дозы тромбоцитного препарата, а также на выбор эффективной формы препарата. Тромбоциты БоТП можно использовать в неактивированном и активированном виде, а также в форме лизата. Концентрирование тромбоцитов путем центрифугирования позволяет из одной пробы сразу получить БоТП и бедную тромбоцитами плазму (БедПл). В процессе исследования было установлено, что двухэтапное центрифугирование при 300 g и 700 g значимо не снижает качество

тромбоцитов и не вызывает их необратимой активации в составе выделенной БоТП. При этом секретлируемые тромбоцитами факторы присутствуют не только в лизате препаратов с исходно высокой концентрацией клеток, но также в лизате БедПл. Уровень VEGF и TGF- $\alpha$  в БедПл был выше, чем в БоТП, и заметно выше, чем в сыворотке крови. Уже известно, что наряду с БоТП репаративный эффект может оказывать плазма, небогатая тромбоцитами, а также бедная тромбоцитами плазма [30]. Это может быть во многом обусловлено частичным выходом гранул в процессе центрифугирования тромбоцитов при ускорении 700 g и выше. Не исключено, что в БедПл ростовые факторы попадают как в составе цельных гранул тромбоцитов, так и в растворенном виде, через открытую канальцевую систему тромбоцитов.

Оправданность наличия лейкоцитов в БоТП до сих пор является дискуссионной. С одной стороны, лизаты ЛейкБоТП содержат более высокий уровень репаративных цитокинов [230], в частности PDGF, что было подтверждено в нашем исследовании. С другой стороны, лейкоциты могут заметно повышать провоспалительный и про-апоптотический эффект БоТП [176]. Мы установили, что по мере увеличения концентрации лейкоцитов в БоТП возрастал уровень провоспалительных интерлейкинов. Кроме того, на примере образцов ЛейкБоТП и ПассПл можно видеть, что лейкоцитарный материал заметно снижает уровень VEGF в конечном лизате. В связи с этим использование лейкоцит-насыщенных БоТП требует дальнейшего детального исследования, и может быть оправдано, там, где не требуется стимуляция ангиогенеза, например, при лечении дефектов роговицы. В норме гранулы тромбоцитов содержат большое количество веществ, обладающих протеолитической активностью, которые в условиях плазмы крови могут вызывать быстрое расщепление факторов роста как при 37°C, так и при 20-22°C. Кроме того, значительная часть ростовых факторов может быть сорбирована молекулами альбумина [207]. В связи с этим для повышения сохранности ростовых факторов представляется оправданным отмывать

тромбоциты от плазмы до этапа криодеструкции. В лизатах отмытых тромбоцитов (ОтмТр) была выявлена максимальная концентрация факторов роста из всех изученных препаратов на основе тромбоцитов человека. Вместе с тем, для оптимизации методик приготовления биопрепаратов с тромбоцитарными компонентами необходимо комплексное исследование биологического эффекта этих препаратов как *in vitro*, так и *in vivo*. Нужно признать, что содержание факторов роста и дифференцировки в лизате БоТП может зависеть от многих параметров, в т.ч. – от режимов хранения и разморозки лизатов [57, 69, 86, 87, 223]. Значительная часть тромбоцитарных факторов является короткоживущими, поэтому любое изменение технологии подготовки лизата может влиять на их концентрацию. В результате концентрация одного и того же фактора в лизатах БоТП может отличаться в 10 и более раз при сопоставимой общей концентрации тромбоцитов в исходных БоТП. Можно предположить, что биологический эффект компонентов БоТП зависит не только от их объема, но и от соотношения разных факторов, а также от среды, в которой они находятся. Это указывает на необходимость стандартизации процедуры пробоподготовки препаратов на основе тромбоцитов для клинического применения, а также необходимость мониторинга качества исходных тромбоцитов.

Проведенное исследование не выявило корреляционной связи между общим содержанием тромбоцитов в БоТП и их морфофункциональным статусом, а также с их цитокиновым составом. Таким образом, высокие дозы БоТП с большим количеством клеток могут быть потенциально неэффективными из-за низкого биологического потенциала тромбоцитов в их составе. С другой стороны, сохранность секретируемых тромбоцитами ростовых факторов в лизатах заметно повышается при отмывании тромбоцитов от плазмы. Стоит особо подчеркнуть, что ростовые факторы (PDGF, EGF, VEGF, TGF- $\alpha$ ) выявлялись как в богатой, так и в бедной тромбоцитами плазме, при этом концентрация VEGF и TGF- $\alpha$  в БедПл была сопоставима с той, что наблюдалась в БоТП. Следовательно, препараты на основе БедПл также могут обладать



репаративным действием, и более того, в ходе самой процедуры выделения БоТП и БедПл появляется возможность регуляции цитокинового состава конечного продукта. С другой стороны, установленная нами высокая корреляционная связь между уровнем разных факторов указывает на то, что в составе нативных тромбоцитов эти факторы являются ко-локализованными, т.е. содержатся в одних и тех же гранулах. В условиях направленной (селективной) дегрануляции можно добиться выделения определенного сочетания цитокинов в готовом препарате.

При работе с культурами клеток *in vitro* нами установлены диапазоны доз тромбоцитных препаратов БоТП, которые являются оптимальными в расчете на стандартное число клеток. Стоит признать, что дозозависимый эффект стимуляции или подавления клеток *in vitro* может отсутствовать при использовании тромбоцитных препаратов *in vivo*. При введении в организм возможно ускоренное разрушение тромбоцитных компонентов, их вымывание или поглощение клетками, не участвующими в репаративном процессе. Поэтому исследования клеток *in vitro* нужно рассматривать как модель, которая отражает позитивные и негативные стороны тромбоцитных препаратов, однако не предсказывает полностью их эффект в клинической практике. В целом, подбор адекватной дозы БоТП и других тромбоцитных препаратов является весьма существенным в регенеративной медицине. Многие авторы признают, что очень часто тромбоцитные препараты не оказывают желаемого эффекта. Это связано как с выбором дозы БоТП, так и с ее подготовкой. Неожиданно эффективной была идея исследовать тромбоциты, отмытые от плазмы. В биохимии и молекулярной биологии исследование отдельных белков всегда проводится в бесплазменной среде [92, 293], т.е. процесс отмыwania тромбоцитов от плазмы всегда является обязательным при работе с тромбоцитарным материалом. Как правило, в таких работах объектом исследования являются отдельные вещества или их взаимодействие с другими веществами, но не цитокиновый состав тромбоцита в целом. Изготовление тромбоцитарных лизатов описано в огромном числе работ, при этом везде лизат готовили на основе БоТП. При

сравнении лизатов БоТП и ОтмТр, исходно содержащих равное число тромбоцитов с гранулами, было установлено, что уровень ростовых факторов в лизатах ОтмТр в 2-5 раз превышает аналогичные показатели для лизатов БоТП, взятой у того же донора. Одновременно с этим, лизаты ОтмТр содержали гораздо меньше провоспалительных цитокинов. В культуре ММСК увеличение дозы лизатов БоТП вызывало постепенное ингибирование роста клеток и угнетение их структурной целостности, тогда как дозы лизатов ОтмТр могли отличаться в 10 и более раз и при этом все они давали рост-стимулирующий эффект. Биологический механизм этого эффекта до конца не ясен и требуется более подробного исследования. По всей видимости, сочетание высоких концентраций провоспалительных цитокинов и ростовых факторов вызывает массовое развитие апоптоза клеток и обусловлено негативным синергетическим эффектом. В лизатах ОтмТр уровень провоспалительных цитокинов резко снижен по сравнению с лизатами БоТП, в результате негативный синергетический эффект цитокинов отсутствует. В целом, было экспериментально подтверждено, что в культуре клеток препараты на основе БоТП обладают дозозависимым эффектом. Не исключено, что использование лизата отмытых тромбоцитов в клинической практике будет более эффективным по сравнению с БоТП. Вместе с тем, необходимо учитывать, что в растворенном виде ростовые факторы являются быстроразрушающимися соединениями. Инкорпорирование тромбоцитарных факторов внутри твердого или гелеобразного субстрата значительно повышает их сохранность и пролонгирует репаративный эффект. Простейшим способом инкорпорирования является использование субстратов и покрытий с высокой адсорбирующей способностью. К ним относятся коллагеновые матрицы с рыхлой структурой коллагена, а также углеводные полимеры. Активированная БоТП и лизат БоТП хорошо адсорбируются коллагеновыми трансплантатами, увеличивают их адгезивную привлекательность для клеток, а также стимулируют пролиферацию клеток в их составе. Также было показано, что коллагеновые повязки являются очень удобным матриком для насыщения стабилизированными тромбоцитами.

Репаративный эффект коллагеновых матриц широко описан в литературе [18-20, 58, 73], при этом стоит учитывать, что сам по себе коллаген проявляет только биокондуктивные свойства, т.е. привлекает в зону своего расположения клетки, но не стимулирует априори их рост. Сравнение динамики роста клеток на дне пластикового флакона и на коллагеновых матриксах показало, что без добавления ростовых факторов скорость роста культур ММСК и М-22 в составе коллагеновых повязок была в среднем в 2,0-2,2 раза ниже, чем на пластике. Только добавление ростовых добавок в виде тромбоцитов или их компонентов стимулировало пролиферацию клеток. Также нужно отметить, что в составе коллагеновых повязок можно было выявить зоны, где клетки практически не адгезировали, не мигрировали и не давали роста даже в контроле. Как правило, это было связано с деформацией коллагена в тех зонах.

Одним из специфических свойств тромбоцитов является их способность стимулировать полимеризацию фибрина *in vitro* с последующим образованием тромбоцитарного геля. Простота получения этого аппликативного препарата делает тромбоцитарный гель весьма перспективным в практике ЛПУ. Главным ограничением здесь является быстрая ретракция геля с разделением на жидкую фракцию и тромбофибриновый сгусток, сохраняющий гелевидную консистенцию. В составе ТФ могут быть инкорпорированы тромбоцитарные факторы, а также цельные тромбоцитарные гранулы, однако их общий объем достаточно мал по сравнению с общим содержанием факторов в исходной БоТП. ТФ, полученный стандартным способом, *in vitro* имеет довольно низкий рост-стимулирующий эффект. Увеличить сохранность гранул в составе ТФ позволяет метод получения тромбоцитарного геля при комнатной температуре с использованием канонических и неканонических факторов активации тромбоцитов. Предложенный нами метод осуществляется с помощью простого и недорогого инструментария, широкодоступного в практике ЛПУ. Полученный ТФ обладает выраженным рост-стимулирующим эффектом, поэтому может быть использован для лечения разных тканевых дефектов. Подготовленную и активированную при 20-22°C БоТП можно инъекционно вводить в полости с

дальнейшим формированием в них геля, также можно использовать ТФ из геля. ТФ может быть инкорпорирован в составе микрокристаллической целлюлозы без потери рост-стимулирующих свойств. В клинической практике трансплантаты на основе целлюлозы пока не получили распространения, однако неоднократные исследования показывают потенциальную перспективность целлюлозных матриц. Целлюлоза обладает высокими адсорбирующими свойствами, поэтому является очень эффективной для инкорпорирования тромбоцитных препаратов.

Проблема получения биомедицинских изделий, содержащих репаративные факторы, остается высоко актуальной для многих разделов медицины. К настоящему времени существует большое количество свидетельств о репаративном действии клеток человека и секретируемых ими компонентов, особенно при лечении обширных ран [58, 76, 192]. В рамках экспериментальных исследований на основе ММСК и других клеток готовят биоконструкции в форме клеточных пластов, клеточных сфероидов, сложных трехмерных моделей, также есть много данных о получении тканеинженерных конструкций с помощью 3-D печати. Однако практически все экспериментальные биоконструкции еще не нашли широкого внедрения в клиническую практику. В нашей стране использование клеточных культур в медицине сталкивается с дополнительными административно-правовыми аспектами. В настоящее время в РФ использование культивированных клеток человека в медицинских целях регламентируется Федеральным Законом от 23 июня 2016 г. N 180-ФЗ "О биомедицинских клеточных продуктах" (с изменениями и дополнениями). Особенности этого закона делают крайне сложным лицензирование клеточных линий, а также методик их получения. В результате, на сегодняшний день биоконструкции с культивированными клетками разрешены к использованию только в рамках научно-исследовательских работ. Это ограничение не касается некультивированных клеток, однако сразу получить необходимый объем диплоидных клеток, с нужным физиологическим и функциональным статусом чрезвычайно трудно. В текущих условиях особенно ценным представляется

использование биологического потенциала тромбоцитов. Тромбоциты легко выделяются из аутологичной крови, могут быть комбинированы с самыми различными матриксами, раневыми покрытиями и другими изделиями, разрешенными в медицинской практике. Недостатком тромбоцитов является то, что в отличие от диплоидных клеток они не могут поддерживать свой гомеостаз в течение многих дней, тромбоцитарные компоненты также являются короткоживущими. Вместе с тем, установлено, что после однократного введения тромбоцитных препаратов их эффект сохранялся и спустя 2-4 недели и значительно ускорял репаративные процессы [16, 74]. Биологические механизмы этого процесса еще неясны. Можно предположить, что инъекция тромбоцитных препаратов вызывала быструю миграцию в зону введения фибробластов, ММСК и других клеток, обладающих репаративным потенциалом. На первом этапе эти клетки использовали секреторные вещества тромбоцитов, что стимулировало их собственную репаративную активность, которая оказывала эффект на более поздних сроках, уже в отсутствие тромбоцитарных компонентов. Тромбоцитные препараты являются высокоаттрактивными для фибробластоподобных клеток, что нашло подтверждение и в этой работе. Вопрос о необходимости повторного или многократного введения тромбоцитных препаратов, безусловно, является актуальным и требует подробного экспериментального исследования. В процессе работы с экспериментальными ранами у животных нами получены обнадеживающие результаты относительно клинической эффективности предложенных тромбоцитных препаратов. Стоит признать, что при исследовании экспериментальных ран в составе раневых покрытий изначально использовались ксеногенные тромбоциты (клетки донора-добровольца), что в значительной мере могло стать причиной интенсивной воспалительной реакции на ранних стадиях лечения. Очень вероятно, что ксеногенное происхождение тромбоцитного материала не позволило в полной мере наблюдать репаративный эффект повязок с тромбоцитами в экспериментальных ранах. Вместе с тем, присутствие тромбоцитов в раневых покрытиях значительно усиливало миграцию фибробластов и макрофагов в область раны в раннем периоде, кроме

того у животных с поверхностной раной также наблюдалась очень активная миграция эпителия из дериватов кожи. Коллагеновые повязки с тромбоцитами стимулировали рост грануляционной ткани и восстановление эпителиального слоя. Нужно сказать, что проведенные нами исследования не выявили явного преимущества стабилизированных тромбоцитов в составе раневых покрытий. Это может быть обусловлено как ксеногенным происхождением материала, так и тем, что выбранная нами доза тромбоцитов не была оптимальной для лечения дефектов ран. В целом, насыщенные тромбоцитами раневые покрытия ускоряли репаративные процессы и не вызывали сильно выраженных осложнений. Безусловно, необходимо более детальное исследование репаративного действия тромбоцит-насыщенных конструкций. В литературе уже довольно часто встречаются данные об использовании лиофилизированных тромбоцитарных компонентов для лечения экспериментальных ран. Как правило, до лиофилизации получают лизат БоТП, который затем высушивают и регидратируют. Есть данные, что лиофилизированные лизаты БоТП в течение 6-9 месяцев сохраняют свой цитокиновый состав [177, 220, 223], т.е. не происходит резкого снижения уровня основных ростовых факторов по сравнению с лизатом исходной БоТП. Показано, что раневые покрытия с лиофилизированным лизатом БоТП дают довольно высокий репаративный эффект, сопоставимый с тем, что наблюдается при аналогичном использовании БоТП. Определенную сложность при получении лиофилизированного материала является его последующая стерилизация. В условиях, когда нет возможности эффективно стерилизовать медицинские изделия, применение лиофилизированной БоТП может быть затруднено. В настоящее время в отделении биотехнологий и трансфузиологии НИИ СП им. Н.В. Склифосовского идет регулярное производство коллагеновых повязок, которые затем стерилизуются гамма-лучами [45, 82, 85]. Потенциально, до этапа стерилизации эти трансплантаты могут быть насыщены тромбоцитами или их компонентами по методикам, описанным в данной работе. После этого повязки можно повторно лиофилировать, а затем отправить на стерилизацию. Конечный

продукт будет представлять собой раневое покрытие на основе коллагена, насыщенное ростовыми факторами, а также другими факторами репарации, и при этом будет возможность хранить такой продукт в течение длительного времени. Даже без учета юридических ограничений производство биоконструкций с использованием аутологичного клеточного материала не может быть массовым, поскольку каждый раз требует комплексного подхода к выделению и культивированию клеток. Использование донорского тромбоцитарного материала в этом плане представляется особенно выгодным, поскольку позволяет даже из одного КТ получить большое число репаративных доз. Принципиальным является вопрос, какую часть тромбоцитарного биологического потенциала необходимо использовать для решения той или иной задачи. Стоит еще раз повторить, что тромбоциты содержат очень богатый спектр веществ, многие из которых могут вызывать патофизиологические реакции или могут препятствовать нормальному репаративному процессу. Проблема селективного выделения тромбоцитарных компонентов на сегодняшний день остается открытой. С другой стороны, проделанная работа показывает принципиальную возможность такого выделения *in vitro*. Очевидно, что для задач регенеративной медицины, для производства биомедицинских изделий более удобно использовать не сами тромбоциты, а их компоненты. Необходимо помнить, что биологическая активность тромбоцитов может осуществляться в разных формах и с разной степенью интенсивности, которые могут иметь критическое значение при производстве тромбоцитных препаратов. Исследование биологической активности тромбоцитов человека имеет большое значение для разработки способов реализации регенеративного потенциала этих клеток.

## 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- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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- $\alpha$  ( $r=0,757$ ).

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 матриц тромбоцитарными 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 матриц с тромбоцитами. При лечении экспериментальных ожоговых и глубоких механических ран у мышей в эксперименте коллагеновые матрицы, 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.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения БоТП с концентрацией тромбоцитов выше 1000 тыс/мкл рекомендуется использовать двухэтапное центрифугирование с ускорением 300-500 g на первом этапе и 700-1000 g на втором этапе. При концентрировании тромбоцитов не рекомендуется использовать ускорение свыше 2000 g.

2. Комбинация БоТП и диметилсульфоксида может быть использована для получения трансдермальных препаратов, насыщенных ростовыми факторами.

3. Низкоимпульсное лазерное излучение в ультрафиолетовом и красном диапазоне может быть использовано для активации тромбоцитов неинвазивным способом.

4. При насыщении тромбоцитами различных матриц тромбоцитарные гранулы могут быть стабилизированы в адгезирующих тромбоцитах с помощью низких концентраций наночастиц серебра, аскорбиновой кислоты и перекиси водорода. Для сохранения факторов FGF-2, TGF- $\alpha$ , PDGF в тромбоцитах наиболее эффективна концентрация 2,5 мкМ наносеребра, для сохранения EGF и VEGF – 1,25 мкМ наносеребра.

5. При получении тромбоцитных препаратов необходимо учитывать исходное содержание в них тромбоцитов с гранулами. Наличие большого числа лейкоцитов в исходной БоТП увеличивает уровень PDGF и провоспалительных интерлейкинов в готовом лизате. Для получения тромбоцитных препаратов, насыщенных VEGF, необходимо использовать БоТП без лейкоцитов.

6. Предварительное отмывание тромбоцитов от плазмы позволяет получить тромбоцитарный лизат с высоким содержанием ростовых факторов и низким содержанием провоспалительных цитокинов.

7. При получении тромбофибринового сгустка из неконсервированной крови рекомендуется выделять БоТП при 8-12°C с целью повышения сохранности тромбоцитарных гранул и ростовых факторов.

8. Тромбоцитарный гель и тромбофибриновый сгусток с высоким содержанием ростовых факторов могут быть получены при 20-22°C с использованием хлорида кальция и препарата «Адреналина гидрохлорид-Виал». Тромбофибриновый сгусток может быть использован в составе раневых покрытий, костных трансплантатов, тканеинженерных конструкций.

9. Насыщение коллагеновых повязок и дермального матрикса тромбоцитами заметно увеличивает их рост-стимулирующий, репаративный и регенеративный эффект.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдоминальная травма: Руководство для врачей [Текст] / под ред. А.С. Ермолова, М.Ш. Хубутя, М.М. Абакумова. – М: «Издательский дом Видар», 2010. –504 с.
2. Алентьев, А.Ю. Газопроницаемость и гемосовместимость новых перфторированных полимеров для оксигенации крови [Текст] / А.Ю. Алентьев, Н.А. Белов, Р.Ю. Никифоров [и др.] // Мембраны и мембранные технологии. –2018. –Т. 8, № 4. –С. 217-223.
3. Андреев, В.Н. Сопоставление редокс-потенциала и антиоксидантной активности сыворотки крови [Текст] / В.Н. Андреев, А.К. Евсеев Г.Р. Гараева [и др.] // Молекулярная медицина. –2013. –№ 4. –С. 37-40.
4. Бабушкин, А.В. Влияние наночастиц золота на систему гемостаза человека [Текст] / А.В. Бабушкин, А.В. Чеканов, О.А. Баранова [и др.] // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. –2013. –№ 2. –С. 25-28.
5. Бакунович, А.В. Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов [Текст] / А.В. Бакунович, К.Я. Буланова, Л.М. Лобанок [и др.] // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. –2017. –№ 4. –С. 40-51.
6. Боровкова, Н.В. Раневые покрытия из разрушаемых природных полимеров полигидроксиалканоатов (пга): получение и свойства [Текст] / Н.В. Боровкова, А.К. Евсеев, Ю.В. Андреев [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология. –2016. –Т. 9, № 1. –С. 88-97.
7. Бухарова, Т.Б. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля / Т.Б. Бухарова, А.В. Волков, Е.Н. Антонов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. –2013. –№ 4. –С.61-68.
8. Ваваев, А.В. Антиоксидантное и антиагрегационное действие ковалентного биферментного конъюгата супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза на тромбоциты [Текст] / А.В. Ваваев,

Л.И. Бурячковская, Е.Г. Тищенко [и др.] // Биомедицинская химия. –2012. –Т. 58, № 3. –С. 300-309.

9. Ваваев, А.В. Влияние пероксида водорода и производных каталазы на функциональную активность тромбоцитов [Текст] / А.В. Ваваев, Л.И. Бурячковская, И.А. Учитель [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. –2011. –Т. 152, № 9. –С. 275-280.

10. Варламова, С.В. Дополнительные критерии оценки состояния здоровья доноров аппаратного тромбоцитафереза [Текст] / С.В. Варламова, Н.Н. Калинин, М.О. Егорова [и др.] // Гематология и трансфузиология. –2014. –Том 59, № 1. –С. 19-25.

11. Васильев, С.А. Структура и функции тромбоцитов [Текст] / С.А. Васильев, В.Л. Виноградов, З.К. Карабудагова // Гематология и трансфузиология. –2010. –Т.55, №5. –С. 4-9.

12. Волков, А.А. Возможности повышения биодоступности антибактериального иммуномодулятора – кристафона [Текст] / А.А. Волков, Н.Б. Мельникова, Л.Н. Нистратова [и др.] // Медицинский альманах. –2011. –№ 1. –С.238-242.

13. Горбатенкова, Е.А. Реактивация супероксиддисмутазы излучением гелий-неонового лазера [Текст] / Е.А. Горбатенкова, О.А. Азизова, Ю.А. Владимиров // Биофизика. –1988. –№ 33. –С. 717-718.

14. Гудков, С.В. Биоантиоксиданты (часть 2). [Текст] / С.В. Гудков, В.И. Брусков, А.В. Куликов // Альманах клинической медицины. –2014. –№ 31. –С. 65-69.

15. Гулякин, И.Д. Солюблизация гидрофобных противоопухолевых препаратов (обзор) [Текст] / И.Д. Гулякин, Н.А. Оборотова, В.М. Печенников // Химико-фармацевтический журнал. –2014. –№ 3. –С.46-50.

16. Деркачев, В.С. Мезенхимальные стволовые клетки в регенерации дефектов костной ткани [Текст] / В.С. Деркачев, С.А. Алексеев, Д.В. Деркачев [и др.] // ACTUAL SCIENCE. –2016. –Т. 2, № 10. –С. 37-39.

17. Евсеев, А.К. Анализ зависимостей потенциала платинового электрода при разомкнутой цепи от времени в сыворотке крови [Текст] / А.К. Евсеев, А.В. Пинчук, В.Н. Андреев [и др.] // Физикохимия поверхности и защита материалов. –2014. –Т. 50, № 4. –С. 445-448.

18. Ермолов, А.С. Биологическая повязка для лечения ожогов [Текст] / А.С. Ермолов, С.В. Смирнов, В.Б. Хватов [и др.] // Патент на изобретение RU 2314129 C1, 10.01.2008. Заявка № 2006122784/15 от 27.06.2006.

19. Ермолов, А.С. Применение биологически активных раневых покрытий, стимулирующих регенерацию эпителия ожоговых ран IIIa степени [Текст] / А.С. Ермолов, С.В. Смирнов, В.Б. Хватов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2008. –№ 3. –С. 166-170.

20. Ермолов, А.С. Оценка возможности использования тканевых трансплантатов в абдоминальной хирургии [Текст] / А.С. Ермолов, Т.П. Македонская, М.В. Радыгина [и др.] // Хирург. –2015. –№ 2. –С. 47-60.

21. Журавлева, М.В. Оценка влияния применения лекарственного препарата тикагрелор у пациентов с острым коронарным синдромом на целевые показатели федерального проекта “Борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями” [Текст] / М.В. Журавлева, С.К. Зырянов, Ф.Н. Палеев [и др.] // Российский кардиологический журнал. –2020. –Т. 25, № 5. –С. 3931.

22. Зайцева, Г.А. Показатели гомеостаза у различных категорий доноров [Текст] / Г.А. Зайцева, М.Е. Ковтунова, Н.В. Исаева [и др.] // Вестник службы крови России. –2013. –№ 4. –С. 20-22.

23. Зотова, Т.Ю. Влияние полиморфизма гена ITGB на частоту развития артериальной гипертензии у больных с острым коронарным синдромом [Текст] / Т.Ю. Зотова, Г.И. Мяндина, В.А. Фролов [и др.] // Клиническая медицина. –2013. –Том 91, № 8. –С. 22-24.

24. Калмыкова, Н.В. Сравнительная характеристика тромбоцитарных лизатов от разных доноров [Текст] / Н.В. Калмыкова, Е.В. Скоробогатая, М.А. Берестовой [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2011. –№ 2. –С. 114-117.

25. Каплунова, М.Ю. Клинический случай стимулирования эпителизации длительно незаживающих ран донорских участков путём местного применения бесплазменных лизатов тромбоцитов [Текст] / М.Ю. Каплунова, В.С. Борисов, И.Н. Пономарев [и др.] // Трудный пациент. –2021. –Т. 19, № 6. –С. 45-49.

26. Кардашова, Д.З. Комплексный подход – основа эффективного лечения алопеции [Текст] / Д.З. Кардашова, И.А. Василенко, В.А. Ли [и др.] // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. –2012. –№ 1. –С. 58-62.

27. Козлов, В.И. Механизмы фотобиостимуляции [Текст] / В.И. Козлов // Лазерная медицина. –2010. –Т. 14, Вып. 4. –С. 4-13.

28. Козловский, В.И. Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. фокус на спонтанную агрегацию [Текст] / В.И. Козловский, О.М. Ковтун, О.П. Сероухова [и др.] // Вестник Витебского государственного медицинского университета. –2013. –Т. 12, № 4. –С. 79-91.

29. Комаров, А.Л. Тестирование функции тромбоцитов для оценки риска тромбозов и кровотечений у больных ИБС, получающих антиагреганты [Текст] / А.Л. Комаров, Е.П. Панченко // Российский кардиологический журнал. –2015. –№3. –С. 25-34.

30. Конторщикова, К.Н. Определение тромбоцитарных факторов роста в небогащенной тромбоцитами плазме [Текст] / К.Н. Конторщикова, К.А. Шахова, О.С. Янченко [и др.] // Медицинский альманах. –2018. –Т. 53, № 2. –С. 41-44.

31. Кореньков, Д.А. Роль микрочастиц в межклеточной коммуникации [Текст] / Д.А. Кореньков, О.М. Овчинникова, С.А. Сельков [и др.] // Цитология. –2014. –Т. 56, № 7. –С. 480-488.

32. Королева, А.А. Антитромбоцитарные препараты для предупреждения и лечения атеротромбоза: метод. рекомендации [Текст] / А.А. Королева, Ю.Л. Журавков // –Минск, 2012. –32 с.

33. Лисицын, М.П. Применение обогащенной тромбоцитами аутоплазмы крови в лечении гонартроза [Текст] / М.П. Лисицын, А.М. Заремук, Е.М. Лисицына [и др.] // Эндоскопическая хирургия. –2020. –Т. 26, № 6. –С. 49-62.

34. Лойко, Е.Н. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированная агрегация тромбоцитов и увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> блокируются ингибиторами внутриклеточной сигнализации [Текст] / Е.Н. Лойко, А.Б. Самаль, С.М. Шуляковская // Биохимия. –2003. –Т. 68, № 11. –С. 1506-1510.

35. Ломакин, Н.В. Взаимосвязь функциональной активности тромбоцитов с прогнозом неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у больных острым коронарным синдромом. Результаты регистрового исследования [Текст] / Н.В. Ломакин, Л.И. Бурячковская, А.Б. Сумароков [и др.] // Кардиология. –2019. –Т.59, №10. –С. 5-13.

36. Мазуров, А.В. Физиология и патология тромбоцитов [Текст] / А.В. Мазуров // – М.: Литерра, 2011. – 248с.

37. Макаров, М.С. Способ оценки морфофункционального статуса тромбоцитов человека и его применение в клинической практике [Текст] / М.С. Макаров, Н.В. Боровкова, И.В. Высочин [и др.] // Медицинский Алфавит. Современная лаборатория. –2012. – №3. – С.32-34.

38. Макаров, М.С. Влияние концентрации тромбоцитарного фактора роста на пролиферативную активность фибробластов человека [Текст] / М.С. Макаров, М.В. Сторожева, О.И. Конюшко [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2013. –№2. –С. 111-115.

39. Макаров, М.С. Морфофункциональный анализ тромбоцитов человека с помощью витального окрашивания [Текст] / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. –2013. –№ 9. –С. 388-391.



40. Макаров, М.С. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения [Текст] / М.С. Макаров, Е.Н. Кобзева, И.В. Высочин [и др.] // Альманах клинической медицины. –2014. –№ 30. –С. 83-87.

41. Макаров, М.С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии [Текст]: Дис. ... канд. биол. наук: 14.01.21 – Гематология и переливание крови / Макаров Максим Сергеевич – М. 2014. –124с.

42. Максименко, А.В. Лечебное и превентивное действие биферментного препарата супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза при эндотоксическом шоке [Текст]/А.В. Максименко, А.В. Ваваева, А.А. Абрамов [и др.] // Технологии живых систем. –2014. Т. 11, № 2. –С. 35-43.

43. Мартьянов, А.А. Компьютерное моделирование внутриклеточной сигнализации при активации тромбоцитов крови фукоиданом [Текст] / А.А. Мартьянов, Ф.А. Балабин, А.С. Майоров [и др.] // Биологические мембраны. –2018. –Т. 35, № 5. –С. 364-375.

44. Маскурова, Ю.В. Клиническое обоснование комплексного применения антиоксидантов и лазерной терапии при лечении заболеваний пародонта [Текст] / Ю.В. Маскурова, З.В. Лалиева, О.Н. Рисованная [и др.] // Клиническая стоматология. –2019. –№ 1 (89). –С. 28-30.

45. Методологические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов [Текст] / под ред. Ткачука В.А. –М.: 2017 – 303 с.

46. Момот, А.П. Тромбоцитарные микровезикулы и их роль в обеспечении гемостатического потенциала (обзор литературы) [Текст] / А.П. Момот, Н.О. Царигородцева, Д.В. Фёдоров [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. –2020. –Т. 40, № 2. –С. 1-14.

47. Москвин, С.В. Плазмаферез и лазерное освечивание крови [Текст] / С.В. Москвин, Т.А. Фёдорова, Т.С. Фотеева // М.–Тверь: Триада, 2018. –416 с.

48. Муравьев, Ю.В. О механизме лечебного действия диметилсульфоксида при ревматоидном артрите [Текст] / Ю.В. Муравьев, Я.А. Сигидин, П.Я. Мульдьяров [и др.] // Терапевтический архив. –1989. –№ 2. –110-112.

49. Носенко, М.А. Провоспалительные цитокины и заживление кожных ран у мышей [Текст] / М.А. Носенко, С.Г. Амбарян, М.С. Друцкая // Молекулярная биология. –2019. –Т. 53, № 5. –741-754.

50. Оболенский, В.Н. Применение тромбоцитарных факторов роста и коллагеновых биопрепаратов в лечении больных с хроническими трофическими язвами различной этиологии [Текст] / В.Н. Оболенский, Д.А. Ермолова // Хирургия. –2012. –№ 5(42). –С. 42-47.

51. Оболенский, В.Н. Современные методы лечения хронических ран [Текст] / В.Н. Оболенский // Медицинский Совет. –2016. –№10. –С. 148-154.

52. Оптическая биомедицинская диагностика. В 2 т. Т.1/ пер. с англ. под ред. В.В. Тучина // –М.: ФИЗМАТЛИТ, 2017. –560 с.

53. Остапенко, В.А. Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом, и ишемическая болезнь сердца [Текст] / В.А. Остапенко, И.А. Гришечкина, И.А. Викторова // ОМСКИЙ НАУЧНЫЙ ВЕСТНИК. –2012. –№ 2. –С. 14-17.

54. Очкуренко, А.А. Применение богатой тромбоцитами плазмы в лечении эпикондилита плеча [Текст] / Очкуренко А.А., С.Н. Савельев, Т.О. Байматов // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. –2020. –Т. 27, № 1. –С. 98-102.

55. Пантелеев, М.А Тромбоциты и гемостаз [Текст] / М.А. Пантелеев, А.Н. Свешникова // Онкогематология. –2014. –№ 2. –С. 65-73.

56. Петрищев, Н.Н. Сравнительное изучение влияния модулированного светодиодного облучения крови (630 нм, 450 нм) на агрегационную активность тромбоцитов [Текст] / Н.Н. Петрищев, Б.В. Зубов, И.Н. Дементьева // Лазерная медицина. –2011. –Т. 15, Вып. 3. –С. 49-52.

57. Полесский, М.Г. Экспериментальное обоснование применения лиофилизата комплекса аутогенных тромбоцитарных факторов роста (аутолтфр) для лечения больных с ложными суставами трубчатых костей нижней конечности [Текст] / М.Г. Полесский, В.Г. Самодай, С.В. Рябинин // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. –2016. –№ 1. –С. 109-111.

58. Похитонов, Д.Ю. Экспериментальное обоснование и клиническое применение комбинации дермального матрикса с аллогенными или аутологичными клетками для лечения обширных травматических ран [Текст] / Д.Ю. Похитонов, Н.В. Боровкова, О.П. Филиппов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2014. –№ 2. –С. 127-132.

59. Рагимов, А.А. Инфузионно-трансфузионная терапия-Сер. Библиотека врача-специалиста: трансфузиология [Текст] / А.А. Рагимов, Г.Н. Щербакова // –М.: Геотар-Медиа, 2010. –235с.

60. Пушкина, Т.А. Супероксиддисмутаза в составе антиоксидантной терапии: состояние вопроса и перспективы [Текст] / Т.А. Пушкина, Э.С. Токаев, Т.С. Попова [и др.] // Неотложная медицинская помощь. Журнал им. Н.В. Склифосовского. –2016. –№. 4. –С. 42-47.

61. Рахматуллина, Д.М. Методы определения спонтанной агрегации тромбоцитов [Текст] / Д.М. Рахматуллина // Вестник современной медицины. –2017. –Т. 10, № 3. –С. 60-65.

62. Роскин, Г.И. Микроскопическая техника [Текст] / Г.И. Роскин, Л.Б. Левинсон // – М.: Советская наука, 1957. –470с.

63. Рутберг, Р.А. Простой и быстрый метод определения содержания фибриногена плазмы [Текст] / Р.А. Рутберг // Лабораторное дело. –1961. –№ 6. –С. 6-7

64. Рыбин, А.В. Применение обогащенной тромбоцитами плазмы для стимуляции биопластических процессов после артроскопической реконструкции передней крестообразной связки коленного сустава (обзор литературы) [Текст] /

А.В Рыбин, И.А. Кузнецов, Г.И. Нетылько [и др.] // Травматология и ортопедия России. –2015. –№ 2 (76). –С. 106-116.

65. Самаль, А.Б., Хмара Н.Ф., Черенкевич С.Н. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы [Текст] / А.Б. Самаль, Н.Ф. Хмара, С.Н. Черенкевич // –Минск: Университетское, 1990. –104с.

66. Самаль, А.Б. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированная агрегация и дезагрегация тромбоцитов [Текст] / А.Б. Самаль, С.Н. Черенкевич, Н.Ф. Хмара // Гематология и трансфузиология. –1988. –Т. 33, № 11. –С. 34-37.

67. Самаль, А.Б. Образование лактозорезистентных агрегатов тромбоцитов под действием лектина омелы белой и различные сигнальные ответы клеток на лектин и тромбин [Текст] / А.Б. Самаль, А.В. Тимошенко, Е.Н. Лойко // Биохимия. –1998. –№ 63. –С. 611-619.

68. Самигулина, Г.Р. Различия в состоянии системы гемостаза у выживших и умерших от острого деструктивного панкреатита на ранней стадии заболевания [Текст] / Самигулина Г.Р., Спиридонова Е.А., Ройтман Е.В. [и др.] // Гематология и трансфузиология. –2016. –Т.61, №2. –С. 92-96.

69. Самодай, В.Г. Технология лиофилизации обогащенной тромбоцитами плазмы с сохранением жизнеспособности факторов tgf, pdgf, vegf [Текст] / В.Г. Самодай, М.Г. Полесских // Патент РФ № 2506946. Опубликовано 20.02.2014.

70. Самодай, В.Г. Лиофилизированные аллогенные факторы роста в травматологии и ортопедии как перспективное направление регенеративной медицины [Текст] / В.Г. Самодай, А.О. Стариков, П.И. Калашников // Политравма. –2019. –№ 4. –15-28.

71. Севастьянов, В.И. Технологии тканевой инженерии и регенеративной медицины [Текст] / В.И. Севастьянов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. –2014. –Т. 16, № 3. –С. 93-108.

72. Сергеева, Н.С. Биологические эффекты тромбоцитарного лизата при добавлении в среду культивирования клеток человека [Текст] / Н.С. Сергеева,

Я.Д. Шанский, И.К. Свиридова [и др.] // Гены и клетки. –2014. –Т. 9, № 1. –С. 77-85.

73. Свешникова, А.Н. Роль трансмембранных гликопротеинов, интегринов и серпентинов в адгезии и активации тромбоцита [Текст] / А.Н. Свешникова, А.В. Беляев, М.А. Пантелеев [и др.] // Биологические мембраны. –2018. –Т. 35, № 5. –С. 351-363.

74. Суковатых, Б.С. Стимуляция неоваскулогенеза – новое направление в лечении хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей [Текст] / Б.С. Суковатых, А.Ю. Орлова // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. –2011. –Т. 4, № 1. –С. 79-84.

75. Ткачук, В.А. Пероксид водорода как новый вторичный посредник [Текст] / В.А. Ткачук, П.А. Тюрин-Кузьмин, В.В. Белоусов [и др.] // Биологические мембраны. –2012. –Т. 29, № 1-2. –С. 21-37.

76. Ткачук, В.А. Средство для лечения ожогов и ран на основе цитокинов и факторов роста, секретируемых мезенхимными клетками человека, способ получения средства и способ лечения ожогов и ран [Текст] / В.А. Ткачук, Ж.А. Акопян, А.Ю. Ефименко [и др.] // Патент РФ на изобретение № 2574017. Опубликовано 27.01.2016.

77. Ткачук В.А. Физиологические механизмы обновления клеток и регенерации тканей [Текст] / В.А. Ткачук // Технологии живых систем. –2017. –Т. 14, № 4. –С. 4-11

78. Трегубова, И.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы [Текст] / И.А. Трегубова, В.А. Косолапов, А.А. Спасов // Успехи физиологических наук. –2012. –Т. 43, № 1. –С. 75-94.

79. Улащик, В.С. Фотодинамическая терапия – технология XXI века [Текст] / В.С. Улащик // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. –2013. –№ 1. –С. 36-43.

80. Федосеева, Е.В. Морфофункциональные особенности плазмы, богатой тромбоцитами, и ее применение в офтальмологии [Текст] /

Е.В. Федосеева, Е.В. Ченцова, Н.В. Боровкова [и др.] // Офтальмология. –2018. –Т. 15, № 4. –С. 388-393.

81. Хаспекова, С.Г. Вариации содержания гликопротеина IIb-IIIa ( $\alpha 2\beta 3$  интегрина) у здоровых доноров. Влияние на агрегационную активность тромбоцитов и эффективность действия аспирина [Текст] / С.Г. Хаспекова, О.В. Сироткина, Ю.В. Шиманова [и др.] // Биомедицинская химия. –2008. –Т. 54, № 3. –С. 361-371.

82. Хватов, В.Б. Способ изготовления лиофилизированного аллотрансплантата кости [Текст] / В.Б. Хватов, А.В. Свищев, А.Ю. Ваза [и др.] // Трансплантология. –2016. –№ 1. –С. 13-18.

83. Хренов, П.А. Экспериментальное изучение влияния препарата «Димексид» на вирулентные свойства *Staphylococcus aureus* изолированных из ран [Текст] / П.А. Хренов, Т.В. Честнова // Вестник новых медицинских технологий. –2013. –№ 2. –С. 405-408.

84. Хубутя, М.Ш. Измерения потенциала платинового электрода в крови, плазме и сыворотке крови [Текст] / М.Ш. Хубутя, А.К. Евсеев, В.А. Колесников [и др.] // Электрохимия. –2010. –Т. 46, № 5. –С. 569–573.

85. Хубутя, М.Ш. Способ изготовления дермального матрикса [Текст] / М.Ш. Хубутя, Ю.В. Андреев, Н.В. Боровкова [и др.] // Патент РФ на изобретение 2524619. Опубликовано 27.07.2014.

86. Ченцова, Е.В. Использование лизата богатой тромбоцитами плазмы при неэффективности стандартной терапии у пациентов с эрозиями роговицы [Текст] / Е.В. Ченцова, Е.В. Федосеева, А.О. Петрова [и др.] // Современные технологии в офтальмологии. –2020. –№ 4 (35). –С. 45-46.

87. Шабанов, С.В. Центрифуга для облучения плазмы, богатой тромбоцитами, ультрафиолетовым спектром [Текст] / С.В. Шабанов // Патент на полезную модель 203447 U1, 06.04.2021. Заявка № 2020128674 от 28.08.2020.

88. Шанский, Я.Д. Исследование лизата тромбоцитов человека как перспективной ростовой добавки для культивирования стволовых и других

типов клеток [Текст] / Я.Д. Шанский, Н.С. Сергеева, И.К. Свиридова [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. –2013. –№ 3. –С. 153-158.

89. Шиффман, Ф.Дж. Патофизиология крови [Текст] / Ф.Дж. Шиффман // Пер. с англ. Н.Б. Серебряная, В.И. Соловьев. –М.: Бином, 2016. –448с.

90. Шпак, А.А. Сравнительная эффективность хирургического лечения макулярных разрывов с применением богатой тромбоцитами плазмы крови [Текст] / А.А. Шпак, Д.О. Шкворченко, Е.А. Крупина // Офтальмохирургия. –2018. –№ 3. –С. 75-79.

91. Ягода, А.В. Патология печени и функция тромбоцитов [Текст] / А.В. Ягода, П.В. Корой // –Ставрополь: СтГМА, 2008. –110с.

92. Abbonante, V. A new path to platelet production through matrix sensing [Text] / V. Abbonante, C.A. Di Buduo, C. Gruppi, [et al.] // Haematologica. –2017. – Vol.102, 7. –P. 1150-1160.

93. Agarwal, A. Platelet-rich fibrin in combination with decalcified freeze-dried bone allograft for the management of mandibular degree II furcation defect: A randomised controlled clinical trial [Text] / A. Agarwal, R.G.S. Manjunath, P. Sethi [et al.] // Singapore Dent J. –2019. –Vol. 39, № 1. –P. 33-40.

94. Altaie, A. Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? [Text] / A. Altaie, H. Owston, E. Jones // World J Stem Cells. –2016. –Vol. 26, №. 8(2). –P. 47-55.

95. Amable, P.R. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors [Text] / P.R. Amable, R.B. Carias, M.V. Teixeira [et al.] // Stem Cell Res Ther. –2013. –№ 4. –P.67.

96. Amable, P.R. Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media [Text] / P.R. Amable, M.V.T. Teixeira, R.B.V. Carias [et al.] // PLoS One. –2014. –Vol. 9, № 8. –P. e104662.

97. Anderson, S.D., Efficacy and safety of ticagrelor: a reversible P2Y12 receptor antagonist [Text] / S.D. Anderson, N.K. Shah, J. Yim [et al.] // Ann Pharmacother. –2010. –№ 44. –P. 524-537.

98. Anitua, E. Platelet rich plasma in oral and maxillofacial surgery from the perspective of composition [Text] / E. Anitua, S. Fernández-de-Retana, M.H. Alkhraisat // *Platelets*. –2021. –Vol. 32, №2. –P. 174-182.
99. Arakawa, T., Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins [Text] / T. Arakawa, S.J. Prestrelski, W.C. Kenney [et al.] // *Adv Drug Deliv Rev*. –1993. –№10. –P. 1-28.
100. Arora, S. Cellular responses induced by silver nanoparticles: in vitro studies [Text] / S. Arora, J. Jain, J.M. Rajwade [et al.] // *Toxicol Lett*. –2008. –Vol. 179, № 2. –P. 93-100.
101. Aslan, J.E. Rho GTPases in platelet function [Text] / J.E. Aslan, O.J. McCarty // *J Thromb Haemost*. –2013. –Vol. 11, № 1. –P. 35-46.
102. Ayers, L. Procoagulant and platelet-derived microvesicle absolute counts determined by flow cytometry correlates with a measurement of their functional capacity [Text] / L. Ayers, P. Harrison, M. Kohler [et al.] // *J Extracell Vesicles*. –2014. –№ 3. –P. 10.
103. Bandyopadhyay, D. Silver nano particles prevent platelet adhesion on immobilized fibrinogen. [Text] / D. Bandyopadhyay, H. Baruah, B. Gupta [et al.] // *Indian J Clin Biochem*. –2012. –Vol. 27, № 2. –P. 164-170.
104. Barkalow, K.L. Alpha-adducin dissociates from F-actin and spectrin during platelet activation [Text] / K.L. Barkalow, J.E. Italiano Jr, D.E. Chou [et al.] // *J Cell Biol*. –2003. –Vol. 161, № 3. –P. 557-570.
105. Barnes, C.P. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds [Text] / C.P. Barnes, S.A. Sell, E.D. Boland [et al.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. –2007. –Vol. 59, № 14. –P. 1413-1433.
106. Bearer, E.L. VASP protects actin filaments from gelsolin: an in vitro study with implications for platelet actin reorganizations [Text] / E.L. Bearer, J.M. Prakash, R.D. Manchester [et al.] // *Cell Motil Cytoskeleton*. –2000. –Vol. 47, №4. –P. 351-364.



107. Berger, M. Alterations in Platelet Alpha-Granule Secretion and Adhesion on Collagen under Flow in Mice Lacking the Atypical Rho GTPase RhoBTB3 [Text] / M. Berger, D.R.J. Lutz, J. Lutz [et al.] // Cells. –2019. –Vol.8, №2. –P.149.

108. Berner, A. Biomimetic tubular nanofiber mesh and platelet rich plasma-mediated delivery of BMP-7 for large bone defect regeneration [Text] / A. Berner, J.D. Boerckel, S. Saifzadeh [et al.] // Cell and Tissue Research. –2012. –Vol. 347, № 3. –P. 603-612.

109. Breitbart, H. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser) [Text] / H. Breitbart, T. Levinshal, N. Cohen [et al.] // Journal of Photochemistry and Photobiology B. –1996. –Vol. 34, № 2–3. –P. 117-121.

110. Brewer, C.F. The use of platelet-rich products for skin graft donor site healing: a systematic review and meta-analysis [Text] C.F. Brewer, A. Smith, B.H. Miranda // J Plast Surg Hand Surg. –2021. –Vol. 55, №3. –P. 133-140.

111. Buettner, G.R. Quantitative redox biology: an approach to understanding the role of reactive species in defining the cellular redox environment [Text] / G.R. Buettner, B.A. Wagner, V.G.J. Rodgers [et al.] // Cell Biochem Biophys. –2013. –Vol. 67. –P. 477-483.

112. Bye, A.P. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks [Text] / A.P. Bye, A.J. Unsworth, J.M. Gibbins [et al.] // J Thromb Haemost. –2016. –Vol. 14, №5. –P. 918-930.

113. Bye, A.P. Screening and High-Throughput Platelet Assays[Text] / A.P. Bye, A.J. Unsworth, J.M. Gibbins [et al.] // Methods Mol Biol. –2018. –Vol. 1812. –P. 81-94.

114. Camargo, P.M. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans [Text] / P.M. Camargo, V. Lekovic, M. Weinlaender [et al.] // J Periodontal Res. –2002. –Vol. 37, № 4. –P. 300-306.

115. Calori, G.M. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? [Text] / G.M. Calori, E. Mazza, M. Colombo [et al.] // *Injury*. –2011. – Vol. 42, №2. –P. 56-63.
116. Canobbio, I. Immobilized amyloid A $\beta$  peptides support platelet adhesion and activation [Text] / I. Canobbio, S. Catricalà, L.G. Di Pasqua [et al.] // *FEBS Lett*. –2013. –Vol. 587, № 16. –P. 2606-2611.
117. Carulli, C. Tissue engineering applications in the management of bone loss [Text] / C. Carulli, F. Matassi, R. Civinini [et al.] // *Innocenti M. Clin Cases Miner Bone Metab*. –2013. –Vol. 10, № 1. –P. 22-25.
118. Cervelli, V. Platelet-rich plasma greatly potentiates insulin-induced adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells through a serine/threonine kinase Akt-dependent mechanism and promotes clinical fat graft maintenance [Text] / V. Cervelli, M.G. Scioli, P. Gentile [et al.] // *Stem Cells Transl Med*. –2012. –Vol.1 №3. –P. 206-220.
119. Chai, J. Effect of Liquid Platelet-rich Fibrin and Platelet-rich Plasma on the Regenerative Potential of Dental Pulp Cells Cultured under Inflammatory Conditions: A Comparative Analysis [Text] / J. Chai, R. Jin, G. Yuan [et al.] // *J Endod*. –2019. –Vol.45, №8. –P. 1000-1008.
120. Chen, Z. The role of PI3K/Akt signaling pathway in non-physiological shear stress-induced platelet activation [Text] / Z. Chen, T. Li, K. Kareem [et al.] // *Artif Organs*. –2019. –Vol. 43, №9. –P. 897-908.
121. Chu, G.Y. Stem cell therapy on skin: Mechanisms, recent advances and drug reviewing issues [Text] / G.Y. Chu, Y.F. Chen, H.Y. Chen [et al.] // *J Food Drug Anal*. –2018. –Vol. 26, №1.–P. 14-20.
122. Chu, Y. Dispersion Properties of Nanocellulose: A Review [Text] / Y. Chu, Y. Sun, W. Wu [et al.] // *Carbohydr Polym*. –2020. –№ 250.–P. 116892.
123. Cimmino, G. Colchicine reduces platelet aggregation by modulating cytoskeleton rearrangement via inhibition of cofilin and LIM domain kinase 1 [Text] / G. Cimmino, R. Tarallo, S. Conte [et al.] // *Vascul Pharmacol*. –2018. –№ 111. –P. 62-70.

124. Civinini, R., The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration [Text] / R. Civinini, A. Macera, L. Nistri [et al.] // *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*. –2011. –Vol. 8, № 1. –P. 25-31.

125. Corbalan, J.J. Amorphous silica nanoparticles aggregate human platelets: potential implications for vascular homeostasis [Text] / J.J. Corbalan, C. Medina, A. Jacoby [et al.] // *Int J Nanomedicine*. –2012. –№7. –P. 631-639.

126. Crowe, C.S. Tendon regeneration with a novel tendon hydrogel: in vitro effects of platelet-rich plasma on rat adipose-derived stem cells [Text] / C.S. Crowe, G. Chiou, R. McGoldrick [et al.] // *Plast Reconstr Surg*. –2015. –Vol. 135, № 6. –P. 981-989.

127. Cuenca-Zamora, E.J. Tubulin in Platelets: When the Shape Matters [Text] / E.J. Cuenca-Zamora, F. Ferrer-Marín, J. Rivera [et al.] // *Int J Mol Sci*. –2019. –Vol. 20, № 14. –P. 3484.

128. Dallari, D. Ultrasound-Guided Injection of Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid, Separately and in Combination, for Hip Osteoarthritis: A Randomized Controlled Study [Text] / D. Dallari, C. Stagni, N. Rani [et al.] // *Am J Sports Med*. –2016. –Vol. 44, № 3. –P. 664-671.

129. Da Violante, G. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco 2/TC7 colon tumor cell cultures [Text] / G. Da Violante, N. Zerrouk, I. Richard [et al.] // *Biol Pharm Bull*. –2002. –№ 25. –P. 1600-1603.

130. Dayal, S. Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis [Text] / S. Dayal, K.M. Wilson, D.G. Motto [et al.] // *Circulation*. –2013. –Vol. 127, № 12. –P. 1308-1316.

131. Dean, W.L. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes [Text] / W.L. Dean, M.J. Lee, T.D. Cummins [et al.] // *Thromb Haemost*. –2009. – Vol. 102, № 4. –P. 711-718

132. Devereaux, J. Leucocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Enhances Fibroblast and Extracellular Matrix Activity: Implications in Wound Healing [Text] / J. Devereaux, N. Dargahi, S. Fraser, [et al.] // *Int J Mol Sci*. –2020. –Vol.21, 18. – P.:6519.

133. Degen, R.M. Commercial Separation Systems Designed for Preparation of Platelet-Rich Plasma Yield Differences in Cellular Composition [Text] / R.M. Degen, J.A. Bernard, K.S. Oliver [et al.] // HSS J. –2017. –Vol. 13, № 1. –P. 75-80.

134. Diehl, P. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation [Text] / P. Diehl, A. Fricke, L. Sander [et al.] // Cardiovasc Res. –2012. –Vol. 93, № 4. –P. 633-644.

135. Dixon, D. Managing Diabetic Foot Ulcers: Pharmacotherapy for Wound Healing [Text] / D. Dixon, M. Edmonds // Drugs. –2021. –Vol.81, №1. –P. 29-56.

136. Dobrovolskaia, M.A. Nanoparticle size and surface charge determine effects of PAMAM dendrimers on human platelets in vitro [Text] / M.A. Dobrovolskaia, A.K. Patri, J. Simak [et al.] // Mol Pharm. –2012. –Vol. 9, № 3. –P. 382-393.

137. Dohan Ehrenfest, D.M. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane [Text] / D.M. Dohan Ehrenfest, N.R. Pinto, A. Pereda [et al.] // Platelets. –2018. –Vol. 29, № 2. –P. 171-184.

138. Dunpall, R. An in vitro assessment of the interaction of cadmium selenide quantum dots with DNA, iron, and blood platelets [Text] / R. Dunpall, A.A. Nejo, V.S. Pullabhotla [et al.] // IUBMB Life. –2012. –Vol. 64, № 12. –P. 995-1002.

139. Elder, S. Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation in three-dimensional culture [Text] / S. Elder, J. Thomason // Open Orthop J. –2014. –№ 8. –P.78-84.

140. Essex, D.W. Redox control of platelet aggregation [Text] / D.W. Essex, M. Li // Biochemistry. –2003. –Vol. 42, №1. –P. 129-136.

141. Etulain, J. An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties [Text] / J. Etulain, H.A. Mena, R.P. Meiss // Sci Rep. –2018. –Vol. 8, № 1. –P. 1513.

142. Fekete, N. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and

expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components [Text] / N. Fekete, M. Gadelorge, D. Fürst [et. al] // *Cytotherapy*. –2012. –Vol. 14, № 5. –P. 540-554.

143. Felfering-Borhm, D. Early detection of preeclampsia by determination of platelet aggregability [Text] / D. Felfering-Borhm // *Tromb. Res.* –2000. –Vol. 98, № 2. –P. 139-146.

144. Feng, Y. IL-9 Promotes the development of deep venous thrombosis by facilitating platelet function [Text] / Y. Feng, M. Yu, F. Zhu [et al.] // *Thromb Haemost.* –2018. –Vol. 118, № 11. –P. 1885-1894.

145. Ferreira, J.R. Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning [Text] / J.R. Ferreira, G.Q. Teixeira, S.G. Santos [et al.] // *Front Immunol.* –2018. –№ 9. –P. 2837.

146. Flaumenhaft, R. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles [Text] / R. Flaumenhaft., J.R. Dilks, J. Richardson [et al.] // *Blood*. –2009. –Vol. 113, № 5. –P. 1112–1121.

147. Fernandez-Yague, M.A. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies / M.A. Fernandez-Yague, S.A. Abbah, L. McNamara [et al.] // *Adv Drug Deliv Rev.* –2015. –№84. –P.1-29.

148. Fortier, L.A. The role of growth factors in cartilage repair [Text] / L.A. Fortier, J.U. Barker, E.J. Strauss [et al.] // *Clin Orthop Relat Res.* –2011. –Vol. 469, № 10. –P. 2706-2715.

149. Foster, T.E. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications [Text] / T.E. Foster, B.L. Puskas, B.R. Mandelbaum [et al.] // *Am J Sports Med.* –2009. –№ 37. –P. 2259-2272.

150. Freitag, J. Photoactivated platelet-rich plasma therapy for a traumatic knee chondral lesion [Text] / J. Freitag, A. Barnard, A. Rotstein // *BMJ Case Rep.* –2012. –Vol. 2012. –P. bcr2012006858.

151. Fujioka-Kobayashi, M. Biological characterization of an injectable platelet-rich fibrin mixture consisting of autologous albumin gel and liquid platelet-rich fibrin (Alb-PRF) [Text] / M. Fujioka-Kobayashi, B. Schaller, C.F.A.B. Mourão [et al.] // Platelets. –2021. Vol.32, 1. –P. 4-8.

152. Fukaya, Y. Platelet-rich plasma inhibits the apoptosis of highly adipogenic homogeneous preadipocytes in an in vitro culture system [Text] / Y. Fukaya, M. Kuroda, Y. Aoyagi [et al.] // Exp Mol Med. –2012. –Vol. 44, № 5. –P. 330-339.

153. Gavaskar, A. Nanotechnology: the scope and potential applications in orthopedic surgery [Text] / A. Gavaskar, D. Rojas, F. Videla. // Eur J Orthop Surg Traumatol. –2018. –Vol. 28, №7. –P. 1257-1260.

154. Golebiewska, E.M. Secrets of platelet exocytosis – what do we really know about platelet secretion mechanisms? [Text] / E.M. Golebiewska, A.W. Poole // Br J Haematol. –2014. –Vol. 165, № 2. –P. 204-216.

155. Gupta, S. Evidence-based indications of platelet-rich plasma therapy [Text] / S. Gupta, A. Paliczak, D. Delgado // Expert Rev Hematol. –2021. –Vol.14, №1. –P. 97-108.

156. Gupta, V. Evaluation of platelet-rich plasma on hair regrowth and lesional T-cell cytokine expression in alopecia areata: A randomized observer-blinded, placebo-controlled, split-head pilot study [Text] / V. Gupta, A.S. Parihar, V.K. Sharma [et al.] // J Am Acad Dermatol. –2021. –Vol. 84, №5. –P. 1321-1328.

157. Gurbel, P.A. Do platelet function testing and genotyping improve outcomes in patients treated with antithrombotic agents? [Text] / P.A. Gurbel, U.S. Tantry // Circulation. –2012. –Vol. 125. –P. 1276-1287.

158. Han, X. Exercise and circulating microparticles in healthy subjects [Text] / X. Han, T. Li, Y. Li [et al.] // J Cardiovasc Transl Res. –2021. –Vol.14, №5. –P. 841-856.

159. Hargett, L.A. On the origin of microparticles: From “platelet dust” to mediators of intercellular communication [Text] / L.A. Hargett, N.N. Bauer // Pulm Circ. –2013. –Vol. 3, № 2. –P. 329-340.

160. Harrison, P. Testing platelet function [Text] / P. Harrison, M. Lordkipanidzé // *Hematol Oncol Clin North Am.* –2013. –Vol. 27, №3. –P. 411-441.
161. Hart, R. Platelet-rich plasma in patients with tibiofemoral cartilage degeneration [Text] / R. Hart, A. Safi, M. Komzák [et al.] // *Arch Orthop Trauma Surg.* –2012. –Vol. 20, № 10. –P. 2082-2091.
162. Henderson, T.R. Effects of dimethyl sulfoxide on subunit proteins [Text] / T.R. Henderson, R.F. Henderson, J.L. York // *Ann N Y Acad Sci.* –1975. –№ 243. –P. 38-53.
163. Holst, M.R. Regulated exocytosis: renal aquaporin-2 3D vesicular network organization and association with F-actin [Text] / M.R. Holst, L.G. Jensen, J. Aaron [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* –2021. –Vol. 321, 6. –P. C1060-C1069.
164. Hoover, E.L. The effects of dimethyl sulfoxide on aortic prostacyclin production and serum thromboxane and plasma fibrinogen levels in rabbits fed a normal versus a cholesterol-enriched diet [Text] / E.L. Hoover, M.J. Ross, K Fani. [et al.] // *Surgery.* –1991. –Vol. 109, № 1. –P. 69-75
165. Hu, Q. Role of Platelet-Derived Tgfbeta1 in the Progression of Ovarian Cancer [Text] / Q. Hu, T. Hisamatsu, M. Haemmerle [et al.] // *Clin Cancer Res.* –2017. –Vol. 23, №18. –P. 5611-5621.
166. Huang, S. Osteogenic differentiation of muscle satellite cells induced by platelet-rich plasma encapsulated in three-dimensional alginate scaffold [Text] / S. Huang, S. Jia, G. Liu [et al.] // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* –2012. –Vol. 114(5 Suppl). –P. 32-40.
167. Icli, A. Relationship between mean platelet volume and pulmonary embolism in patients with deep vein thrombosis [Text] / A. Icli, F. Aksoy, Y. Turker [et al.] // *Heart Lung Circ.* – 2015. – Vol. 24, № 11. –P. 1081-1086.
168. Inamochi, A. Simple oral mucosal epithelial transplantation in a rabbit model [Text] / A. Inamochi, A. Tomioka, K. Kitamoto [et al.] // *Sci Rep.* –2019. –Vol. 9, № 1. –P. 18088

169. Irie, K. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee / K. Irie, E. Uchiyama, H. Iwaso // *Knee*. –2003. –№ 10. –P. 93-96.

170. Italiano, J.E. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: Pro- and anti-angiogenic proteins are organized into separate platelet {alpha}-granules and differentially released [Text] / J.E. Italiano, J.L. Richardson, S. Patel-Hett [et al.] // *Blood*. –2008. –№ 111. –P. 1227–1233.

171. Italiano, J.E. Clinical Relevance of Microparticles from Platelets and Megakaryocytes [Text] / J.E. Italiano, A.T.A. Mairuhu, R. Flaumenhaft // *Curr Opin Hematol*. –2010. –Vol. 17, № 6. –P. 578–584.

172. Jiang, L.B. Shape-memory collagen scaffold for enhanced cartilage regeneration: native collagen versus denatured collagen [Text] / L.B. Jiang, D.H. Su, P. Liu [et al.] // *Osteoarthritis Cartilage*. –2018. –Vol. 26, №10. –P. 1389-1399.

173. Jo, C.H. Allogeneic platelet-rich plasma for rotator cuff repair [Text] / C.H. Jo, J.S. Shin, S.Y. Lee [et al.] // *Acta Ortop Bras*. –2017. –Vol. 25, № 1. –P. 38-43.

174. Jones, D.P. Redox sensing: Orthogonal control in cell cycle and apoptosis signaling [Text] / D.P. Jones // *J Intern Med*. –2010. –Vol. 268, № 5. –P. 432-448.

175. Jonsdottir-Buch, S.M. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells [Text] / S.M. Jonsdottir-Buch, R. Lieder, O.E. Sigurjonsson // *PLoS One*. –2013. –Vol. 8, № 7. –P. e68984.

176. Joos, H. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit migration activity of chondrogenic progenitor cells from non-fibrillated osteoarthritic cartilage [Text] / H. Joos, A.Wildner, C.Hogrefe [et al.] // *Arthritis Res Ther*. –2013. –Vol. 15, № 5. –P. R119.

177. Joshi, N.V. Lyophilised reconstituted unman platelets increase thrombus formation in a clinical ex vivo model of deep arterial injury [Text] / N.V. Joshi, J.B. Raftis, A.J. Lucking [et al.] // *Thromb Haemost*. –2012. –Vol. 108, № 1. –P. 176-182.



178. Kargarpour, Z. Platelet-rich fibrin suppresses in vitro osteoclastogenesis [Text] / Z. Kargarpour, J. Nasirzade, F.J. Strauss [et al.] // J Periodontol. –2020. –Vol. 91, №3. –P. 413-421.

179. Karlsson, H.L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes [Text] / H.L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson [et al.] // Chem. Res. Toxicol. –2008. –Vol. 21, № 9. –P. 1726-1732.

180. Kempen, D.H. Growth factor interactions in bone regeneration [Text] / D.H. Kempen, L.B. Creemers, J. Alblas [et al.] // Tissue Eng Part B Rev. –2010. –Vol.16, № 6. –P. 551-566.

181. Kehrel, B. State of the art in platelet function testing [Text] / B. Kehrel, M. Brodde // Transfus Med Hemother. –2013. –Vol. 40, № 2. –P.73-86.

182. Kikuchi, L. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces / L Kikuchi., J.Y. Park, C. Victor [et al.] // Biomaterials. –2005. –Vol. 26, № 26. –P. 5285-5295.

183. Kim, D. On-chip evaluation of platelet adhesion and aggregation upon exposure to mesoporous silica nanoparticles [Text] / D. Kim, S. Finkenstaedt-Quinn, K.R. Hurley [et al.] // Analyst. –2014. –Vol.139, № 5. –P. 906-913.

184. Kim, S.J. Platelets as Modulators of Inflammation [Text] / S.J. Kim, R.P. Davis, C.N. Jenne // Semin Thromb Hemost. –2018. –Vol.44, № 2. –P. 91-101.

185. Kim, S.Y. Wnt5a potentiates U46619-induced platelet aggregation via the PI3K/Akt pathway [Text] / S.Y. Kim, S. Kim, H.S. Yun-Choi [et al.] // Mol Cells. –2011. –Vol. 32, № 4. –P. 333-336.

186. Klatte-Schulz, F. Comparative Analysis of Different Platelet Lysates and Platelet Rich Preparations to Stimulate Tendon Cell Biology: An In Vitro Study [Text] / F. Klatte-Schulz, T. Schmidt, M. Uckert [et al.] // Int J Mol Sci. –2018. –Vol. 19, №1. –P. E212.

187. Kou, Y. Intravascular cells and circulating microparticles induce procoagulant activity via phosphatidylserine exposure in heart failure [Text] / Y. Kou, L. Zou, R. Liu [et al.] // Thromb Thrombolysis. –2019. –Vol. 48, №2. –P.187-194

188. Kotova, Y.N. Binding of Coagulation Factor XIII Zymogen to Activated Platelet Subpopulations: Roles of Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and Fibrinogen [Text] / Y.N. Kotova, N.A. Podoplelova, S.I. Obydenny [et al.] // Thromb Haemost. –2019. –Vol. 119, №6. –P. 906-915.

189. Kreuter, J. Influence of chronobiology on the nanoparticle-mediated drug uptake into the brain [Text] / J. Kreuter // Pharmaceutics. –2015. –Vol.7, №1. –P. 3-9.

190. Kubik, T. Nanotechnology on duty in medical applications [Text] / T. Kubik, K. Bogunia-Kubik, M. Sugisaka // Curr Pharm Biotechnol. –2005. –№ 6. –P. 17-33.

191. Kuchay, S.M. Targeted gene inactivation reveals a functional role of calpain-1 in platelet spreading [Text] / S.M. Kuchay, A.J. Wieschhaus, M. Marinkovic [et al.] // J Thromb Haemost. –2012. –Vol.10, № 6. –P.1120-1132.

192. Lacci, K.M. Platelet-rich Plasma: support for its use in wound healing [Text] / K.M. Lacci, A. Dardik // Yale J Biol Med. –2010. –№ 83. –P. 1-9.

193. Lai, B.F. Abnormal blood clot formation induced by temperature responsive polymers by altered fibrin polymerization and platelet binding [Text] / B.F. Lai, Y. Zou, X. Yang [et al.] // Biomaterials. –2014. –Vol. 35, № 8. –P. 2518-2528

194. Lannan, K. L. Thrombosis, platelets, microparticles, and PAH: More than clot [Text] / K.L. Lannan, P.P. Richard, R.J. White // Drug Discov Today. –2014. –Vol. 19, №8. –P. 1230-1235.

195. Lannan, K.L. Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles [Text] / K.L. Lannan, J. Sahler, N. Kim [et al.] // Front Immunol. –2015. –№ 6. –P.48.

196. Leffler, H. Galectins structure and function – a synopsis [Text] / H. Leffler // Results Probl Cell Differ. –2001. –№ 33. –P. 57-83.

197. Lox, C.D. The effect of topical dimethyl sulfoxide on clotting activity in the Sprague-Dawley rat [Text] / C.D. Lox, N. Frederick, M.W. Heine // Ann N Y Acad Sci. –1983. –№ 411. –P. 340-343.

198. Løvschall, H. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro [Text] / H. Løvschall, D. Arenholt-Bindslev // *Lasers in Surgery and Medicine*. –1994. –Vol. 14, № 4. –P. 347-354.

199. Lubart, R. The effect of HeNe laser (633 nm) radiation on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in fibroblasts [Text] / R. Lubart, H. Friedmann, M. Sinyakov [et al.] // *Laser Therapy*. –1997. –Vol. 9, № 3. –P. 115-120.

200. Malhotra, A. Platelet-rich plasma and bone defect healing [Text] / A. Malhotra, M. Pelletier, R. Oliver [et al.] // *Tissue Eng Part A*. –2014. –№ 20 (19-20). –P. 2614-2633.

201. Marcazzan, S. Efficacy of platelets in bone healing: A systematic review on animal studies [Text] / S. Marcazzan, R.L. Weinstein, M. Del Fabbro // *Platelets*. –2018. –Vol.29, №4. –P. 326-337.

202. Martínez, C.E. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update [Text] / C.E. Martínez, P.C. Smith, V.A. Palma Alvarado // *Front.Physiol*. –2015. –№ 6. –P. 290.

203. Marx, R.E. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts [Text] / R.E. Marx, E.R. Carlson, R.M. Eichstaedt // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radial Endod*. –1998. –Vol. 85, № 6. –P. 638-646.

204. Marx, R.E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use [Text] / R.E. Marx // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. –2004. –Vol. 62, № 4. –P. 489-496.

205. Mayer, A. The role of nanoparticle size in hemocompatibility [Text] / A. Mayer, M. Vadon, B. Rinner [et al.] // *Toxicology*. –2009. –№ 258. –P. 139-147.

206. Mehta, S. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications [Text] / S. Mehta, J.T. Watson // *J Orthop Trauma*. –2008. –Vol. 22, № 6. –P. 432-438.

207. Melzer, M. Lysosomes, growth factor activity, and carcinogenic implications [Text] / M. Melzer // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. –2012. –Vol. 22, № 4. –P. 345-358.

208. Michelson, A.D. Platelets (3rd ed.) [Text] / A.D. Michelson // –Amsterdam : Academic Press, 2013. –1351 p.
209. Mohammed, B.M. Impact of high dose vitamin C on platelet function [Text] / B.M. Mohammed, K.W. Sanford, B.J. Fisher [et al.] // World J Crit Care Med. –2017. –Vol. 6, № 1. –P. 37-47.
210. Mona, M. Secretome Analysis of Inductive Signals for BM-MSC Transdifferentiation into Salivary Gland Progenitors [Text] / M. Mona, F. Kobeissy, Y.J. Park [et al.] // Int J Mol Sci. –2020. –Vol. 21, № 23. –P. 9055.
211. Morimoto, N. Easy-to-use preservation and application of platelet-rich plasma in combination wound therapy with a gelatin sheet and freeze-dried platelet-rich plasma: a case report [Text] / N. Morimoto, N. Kakudo, T. Ogura [et al.] // Eplasty. –2016. –№ 16. –P. 202-207.
212. Morrell, C.N. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. [Text] / C.N. Morrell, A.A. Aggrey, L.M. Chapman [et al.] // Blood. –2014. –Vol. 123, № 18. –P. 2759-2767.
213. Murphy, D.D. Regulation of platelet activity in a changing redox environment [Text] / D.D. Murphy, E.C. Reddy, N. Moran [et al.] // Antioxid Redox Signal. –2014. –Vol. 20, № 13. –P. 2074–2089.
214. Nakamura, Y. Low dose fibroblast growth factor-2 (FGF-2) enhances bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)-induced ectopic bone formation in mice [Text] / Y. Nakamura, K. Tensho, H. Nakaya [et al.] // Bone. –2005. –Vol. 36. –P. 399–407.
215. Navarese, E.P. A critical overview on ticagrelor in acute coronary syndromes [Text] / E.P. Navarese, A. Buffon, M. Kozinski [et al.] // QJM. –2013. –Vol. 106, № 2. –P. 105-115.
216. Nemmar, A. In vitro platelet aggregation and oxidative stress caused by amorphous silica nanoparticles [Text] / A. Nemmar, P. Yuvaraju, S. Beegam [et al.] // Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. –2015. –Vol. 7, № 1. –P. 27-33.
217. Nguyen, M.V.C. Prealbumin, platelet factor 4 and S100A12 combination at baseline predicts good response to TNF alpha inhibitors in rheumatoid arthritis

[Text] / M.V.C. Nguyen, A. Baillet, X. Romand [et al.] // *Joint Bone Spine*. –2019. – Vol. 86, №2. –P. 195-201.

218. Ni, X. Adipose-derived stem cells combined with platelet-rich plasma enhance wound healing in a rat model of full-thickness skin defects [Text] / X. Ni, X. Shan, L. Xu [et al.] // *Stem Cell Res Ther*. –2021. –Vol. 12, № 1. –P. 226.

219. Nie, J. Electrospinning With Lyophilized Platelet-Rich Fibrin Has the Potential to Enhance the Proliferation and Osteogenesis of MC3T3-E1 Cells [Text] / J. Nie, S. Zhang, P. Wu [et. al] // *Front Bioeng Biotechnol*. –2020. –Vol. 1, № 8. –P. 595579.

220. Nolan, G.S. Fat grafting and platelet-rich plasma in wound healing: a review of histology from animal studies [Text] / G.S. Nolan, O.J. Smith, G. Jell [et al.] // *Adipocyte*. –2021. –Vol. 10, № 1. –P. 80-90.

221. Nomura, S. Function and role of microparticles in various clinical settings [Text] / S., Nomura, Y. Ozaki, Y. Ikeda // *Thromb Res*. –2008. –Vol. 123, № 1. –P. 8-23.

222. Notodihardjo, S.C. Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing [Text] / S.C. Notodihardjo, N. Morimoto, N. Kakudo [et al.] // *Regen Ther*. –2018. –№ 10. –P. 1-9.

223. Nurden, A.T. Platelets and wound healing [Text] / A.T. Nurden, P. Nurden, M. Sanchez [et al.] // *Frontiers in Bioscience*. –2008. –Vol. 13, № 9. –P. 3532–3548

224. Nurden, P. Inherited platelet diseases with normal platelet count: phenotypes, genotypes and diagnostic strategy [Text] / P. Nurden, S. Stritt, R. Favier [et al.] // *Haematologica*. –2021. –Vol. 106, № 2. –P. 337-350.

225. Offermanns, S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors [Text] / S. Offermanns // *Circ Res*. –2006. –Vol. 99, № 12. –P. 1293-1304.

226. Okamura, Y. Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute [Text]

/ Y. Okamura, S. Takeoka, K. Eto [et al.] // J Thromb Haemost. –2009. –Vol. 7, № 3. –P. 470-477.

227. Oktay, A.O. Effects of platelet rich plasma and chitosan combination on bone regeneration in experimental rabbit cranial defects [Text] / A.O. Oktay, B. Demiralp, B. Demiralp // The Journal of Oral Implantology. –2010. –Vol. 36, № 3. –P. 175-184.

228. Okuda, K. Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study [Text] / K. Okuda, H. Tai, K. Tanabe [et al.] // J Periodontol. –2005. –Vol. 76, № 6. –P. 890–898.

229. Oliveira, S.M. Platelet lysate-based pro-angiogenic nanocoatings [Text] / S.M. Oliveira, R.P. Pirraco, A.P. Marques [et al.] // Acta Biomater. –2016. –№ 32. –P. 129-137.

230. Owens 3rd , A.P. Microparticles in hemostasis and thrombosis [Text] / A.P. Owens 3rd, N. Mackman // Circ Res. –2011. –№ 108. –P. 1284-1297.

231. Ozdemir, B. Treatment of intrabony defects with betatricalciumphosphate alone and in combination with platelet-rich plasma [Text] / B. Ozdemir, E. Okte // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. –2012. –Vol. 100, № 4. –P. 976-983.

232. Passaretti, F. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivates [Text] / F. Passaretti, M. Tia, V. D'Esposito [et al.] // Platelets. –2014. –№25. –P. 252-256.

233. Pastar, I. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review [Text] / I. Pastar, O. Stojadinovic, N.C. Yin [et al.] // Adv Wound Care. –2014. –№ 3. –P. 445-464.

234. Park, K. Chitosan-gelatin-platelet gel composite scaffold for bone regeneration [Text] / K. Park // J Control Release. –2017. –№254. –P. 137.

235. Paterson, K.L. Intra-articular injection of photo-activated platelet-rich plasma in patients with knee osteoarthritis: a double-blind, randomized controlled pilot study [Text] / K.L. Paterson, M. Nicholls, K.L. Bennell [et al.] // BMC Musculoskelet Disord. –2016. –№17. –P. 67.

236. Patel, S. Treatment with platelet-rich plasma is more effective than placebo for knee osteoarthritis: a prospective, double-blind, randomized trial [Text] / S. Patel, M.S. Dhillon, S. Aggarwal [et al.] // Am J Sports Med. –2013. –№ 41. –P. 356-364.

237. Patel-Hett, S. Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules [Text] / S. Patel-Hett, J.L. Richardson, H. Schulze [et al.] // Blood. –2008. –Vol. 111, № 9. –P. 4605-4616.

238. Pedersen, O.B. Lower antiplatelet effect of aspirin in essential thrombocythemia than in coronary artery disease [Text] / O.B. Pedersen, A.M. Hvas, H.B. Ommen [et al.] // TH Open. –2021. –Vol. 5, № 3. –P. e230-e238.

239. Peng, G.L. Platelet-Rich Plasma for Skin Rejuvenation: Facts, Fiction, and Pearls for Practice [Text] / G.L. Peng [et. al] // Facial Plast Surg Clin North Am. – 2019. –Vol. 27, –№3. –P. 405-411.

240. Peng, H. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenesis protein-4 [Text] / H. Peng, V. Wright, A. Usas [et al.] // J Clin Invest. –2002. –№ 110. –P. 751-759.

241. Pham, Q.P. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review [Text] / Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos // Tissue Eng. –2006. –Vol. 12, № 5. –P. 1197-1211.

242. Pereira, R.C. Dual effect of platelet lysate on human articular cartilage: a maintenance of chondrogenic potential and a transient proinflammatory activity followed by an inflammation resolution [Text] /R.C. Pereira, M. Scaranari, R. Benelli [et al.] // Tissue Eng Part A. –2013. –Vol. 19, № 11-12. –P. 1476-1488.

243. Peters, C.G. Granule exocytosis is required for platelet spreading: differential sorting of  $\alpha$ -granules expressing VAMP-7 [Text] / C.G. Peters, A.D. Michelson, R. Flaumenhaft // Blood. –2012. –Vol. 120, № 1. –P. 199-206.

244. Pietramaggiori, G. Tumors stimulate platelet delivery of angiogenic factors in Vivo [Text] / G. Pietramaggiori, S.S. Scherer, D. Cervi [et al.] // Am J Pathol. –2008. –Vol. 173, № 6. –P. 1609–1616.

245. Pinto, L.M. Influence of liposomal local anesthetics on platelet aggregation in vitro [Text] / L.M. Pinto, R. Pereira, E. de Paula [et al.] // J Liposome Res. –2004. –Vol. 14, № 1-2. –P. 51-59.

246. Pirvu, T.N. Platelet-rich plasma induces annulus fibrosus cell proliferation and matrix production [Text] / T.N. Pirvu, J.E. Schroeder, M. Peroglio [et al.] // Eur Spine J. –2014. –Vol. 23, №4. –P. 745–753.

247. Podolnikova, N.P. The interaction of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the  $\alpha$ IIb  $\beta$ -propeller domain [Text] / N.P. Podolnikova, S. Yakovlev, V.P. Yakubenko [et al.] // J Biol Chem. –2014. –Vol. 289, № 4. –P. 2371-2383.

248. Podoplelova, N.A. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting [Text] / N.A. Podoplelova, A.N. Sveshnikova, Y.N. Kotova [et al.] // Blood. –2016. –Vol. 128, № 13. –P. 1745–1755.

249. Ponte, A.L. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities [Text] / A.L. Ponte, E. Marais, N. Gallyay [et al.] // Stem Cells. –2007. –№ 25. –P. 1737-1745.

250. Pratico, D. Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation [Text] / D. Pratico, L. Iuliano, A. Ghiselli [et al.] // Haemostasis. –1991. –Vol. 21. –P. 169–174.

251. Provost, P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs [Text] / P. Provost // Clin Chem Lab Med. –2017. –Vol. 55, №5. –P.657-666.

252. Ramsey, G. Hemostatic efficacy of pathogen-inactivated blood components [Text] / G. Ramsey // Semin Thromb Hemost. –2016. –Vol. 42, № 2. –P. 172-182.

253. Ramtoola, Z. Investigation of the interaction of biodegradable micro- and nanoparticulate drug delivery systems with platelets [Text] / Z. Ramtoola, P. Lyons, K. Keohane [et al.] // J Pharm Pharmacol. –2011. –Vol. 63, № 1. –P. 26-32.



254. Rao, F. PPAR $\gamma$  ligands decrease hydrostatic pressure-induced platelet aggregation and pro-inflammatory activity [Text] / F. Rao, R.Q. Yang, X.S. Chen [et al.] // PLoS One. –2014. –Vol. 9, № 2. –P. e89654.

255. Re, F. 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation [Text] / F. Re, L. Sartore, V. Moulisova [et al.] // J Tissue Eng. –2019. –№10. –P.2041731419845852

256. Reddel, C.J. Procoagulant Effects of Low-Level Platelet Activation and Its Inhibition by Colchicine [Text] / C.J. Reddel, G.J. Pennings, J.L. Curnow [et al.] // Thromb Haemost. 2018. –Vol. 118, № 4. –P. 723-733.

257. Romaniuk, M.A. Human platelets express and are activated by galectin-8 [Text] / M.A. Romaniuk, M.V. Tribulatt, V. Cattaneo [et al.] // Biochem. J. –2010. –№ 432. –P. 535–547.

258. Rothenberg, J.B. Pain and functional outcomes of the sacroiliac joint after platelet-rich plasma injection: a descriptive review [Text] / J.B. Rothenberg, K. Godha, D.M. Civitarese [et al.] // Regen Med. –2021.–Vol. 16, № 1. –P.87-100.

259. Saito, N. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation [Text] / N. Saito, T. Okada, H. Horiuchi [et al.] // Nat Biotechnol. –2001. –№19. –P. 332–335.

260. Samal, A.B. Platelet aggregation and change in intracellular Ca<sup>2+</sup> induced by low frequency ultrasound in vitro [Text] / A.B. Samal, I.D. Adzerikho, A.G. Mrochek [et al.] // European Journal of Ultrasound. –2000. –Vol. 11. –P. 5.

261. Santhakumar, M. A clinicoradiographic comparison of the effects of platelet-rich fibrin gel and platelet-rich fibrin membrane as scaffolds in the apexification treatment of young permanent teeth [Text] / M. Santhakumar, S. Yayathi, N. Retnakumari // J Indian Soc Pedod Prev Dent. –2018. –Vol. 36, № 1. –P. 65-70.

262. Santos-Martinez, M.J. Pegylation increases platelet biocompatibility of gold nanoparticles [Text] / M.J. Santos-Martinez, K. Rahme, J.J. Corbalan [et al.] // J Biomed Nanotechnol. –2014. –Vol. 10, № 6. –P. 1004-1015.

263. Scala, M. Regeneration of mandibular osteoradionecrosis defect with platelet rich plasma gel [Text] / M. Scala, M. Gipponi, P. Mereu [et al.] // *In Vivo*. –2010. –Vol. 24, № 6. –P. 889–893.

264. Scarano, A. Three-Dimensional Architecture and Mechanical Properties of Bovine Bone Mixed with Autologous Platelet Liquid, Blood, or Physiological Water: An In Vitro Stud [Text] / A. Scarano, F. Inchingolo, G. Murmura [et al.] // *Int J Mol Sci*. –2018. –Vol.19, №4. –P.1230.

265. Schattner, M. Platelets and galectins [Text] / M. Schattner // *Ann Transl Med*. –2014. –Vol. 2, № 9. –P. 85.

266. Schubert, P. Towards targeting platelet storage lesion-related signaling pathways [Text] / P. Schubert, D.V. Devine // *Blood Transfus*. –2010. –№ 8 Suppl3. –P. 69-72.

267. Sell, S.A. Incorporating platelet-rich plasma into electrospun scaffolds for tissue engineering applications [Text] / S.A. Sell, P.S. Wolfe, J.J. Ericksen [et al.] // *Tissue Engineering A*. –2011. –Vol. 17, № 21-22. –P. 2723-2737.

268. Semberova, J. Carbon nanotubes activate blood platelets by inducing extracellular Ca<sup>2+</sup> influx sensitive to calcium entry inhibitors [Text] / J. Semberova, S.H. De Paoli Lacerda, O. Simakova [et al.]// *Nano Lett*. –2009. –№ 9. –P. 3312–3317.

269. Shahidi, M. A comparative study between platelet-rich plasma and platelet-poor plasma effects on angiogenesis [Text] / M. Shahidi, M. Vatanmakanian, M.K. Arami [et al.] // *Med Mol Morphol*. –2018. –Vol. 51, № 1. –P. 21-31.

270. Shefa, A.A. Enhancement of hemostatic property of plant derived oxidized nanocellulose-silk fibroin based scaffolds by thrombin loading [Text] / A.A. Shefa, M. Taz, S.Y. Lee [et al.] // *Carbohydr Polym*. –2019. –№ 208. –P. 168-179.

271. Sheridan, R. Skin substitutes in burns [Text] / R. Sheridan, R. Tompkins // *Burns*. –1999. –№ 25. –P. 97-103.

272. Shimizu, M. The behavior of ROS-scavenging nanoparticles in blood [Text] / M. Shimizu, T. Yoshitomi, Y. Nagasaki // J Clin Biochem Nutr. –2014. –Vol. 54, № 3. –P. 166-173.

273. Shrivastava, S. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles [Text] / S. Shrivastava, T. Bera, S.K. Singh [et al.] // ACS Nano. –2009. –Vol. 3, № 6. –P. 1357-1364.

274. Shrivastava, S. Negative regulation of fibrin polymerization and clot formation by nanoparticles of silver [Text] / S. Shrivastava, S.K. Singh, A. Mukhopadhyay [et al.] // Colloids Surf B Biointerfaces. –2011. –Vol. 82, № 1. –P. 241-246.

275. Shyu, K.G. Mechanisms of ascorbyl radical formation in human platelet-rich plasma [Text] / K.G. Shyu, C.C. Chang, Y.C. Yeh [et al.] // Biomed Res Int. –2014. –№ 2014. –P. 614506.

276. Silva, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. [Text] / G.A. Silva // Surg Neurol. –2004. –№ 61. –P. 216–220.

277. Šimundić, M. Effect of engineered TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles [Text] / M. Šimundić, B. Drašler, V. Šuštar [et al.] // BMC Vet Res. –2013. –Vol. 9, № 7. –P. 1-13.

278. Slaninka, I. Use of autologous platelet-rich plasma in healing skin graft donor sites [Text] / I Slaninka, A Fibír, M. Kaška [et al.] // J Wound Care. –2020. –Vol. 29, № 1. –P. 36-41.

279. Smrke, D. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect [Text] / D. Smrke, B. Gubina, D. Domanović [et al.] // Eur Surg Res. –2007. –Vol. 39, № 3. –P. 170–174.

280. Smyth, E. Induction and enhancement of platelet aggregation in vitro and in vivo by model polystyrene nanoparticles [Text] / E. Smyth, A. Solomon, A. Vydyanath // Nanotoxicology. –2015. –Vol. 9, № 3. –P. 356-364.

281. Snoep, J.D. Clopidogrel nonresponsiveness in patient undergoing percutaneous intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis [Text]

/ J.D. Snoep, M.M. Hovens, J.C. Eikenboom [et al.] // Am Heart J. –2007. –Vol. 154, № 2. –P. 221-231.

282. Song, B. Leukocyte-rich platelet-rich plasma application in post-traumatic osteoarthritis with popliteal cyst: a case report [Text] / B. Song, P.C. Yeh, P. Jayaram [et al.] // Regen Med. –2020. –Vol. 15, 6. –P. 1695-1702.

283. Stevens, K.N. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood [Text] / K.N. Stevens, O. Crespo-Biel, E.E. van den Bosch [et al.] // Biomaterials. –2009. –Vol. 30, № 22. –P. 3682-3690.

284. Strandberg, G. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate [Text] / G. Strandberg, F. Sellberg, P. Sommar [et al.] // Transfusion. –2017. –№ 57. –P. 1058-1065.

285. Suh, S. The role of platelet-rich plasma therapy in refractory folliculitis decalvans [Text] / S. Suh, C. Nguyen, L. Zhao [et al.] // JAAD Case Rep. –2021. –№ 12. –P. 85-87.

286. Sugimori, E. Effects of apatite foam combined with platelet-rich plasma on regeneration of bone defects [Text] / E. Sugimori, S. Shintani, K. Ishikawa [et al.] // Dent Mater J. –2006. –№ 25. –P. 591-596.

287. Sugiya, H. Role of aquaporins and regulation of secretory vesicle volume in cell secretion [Text] / H. Sugiya, M. Matsuki-Fukushima, S. Hashimoto // J Cell Mol Med. –2008. –№ 12(5A). –P. 1486-1494.

288. Suzuki, Y. Activated platelet-based inhibition of fibrinolysis via thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor activation system [Text] / Y. Suzuki, H. Sano, L. Mochizuki [et al.] // Blood Adv. –2020. –Vol.4, №21. –P. 5501-5511.

289. Tanaka, H. Additional Effects of Platelet-Rich Fibrin on Bone Regeneration in Sinus Augmentation With Deproteinized Bovine Bone Mineral: Preliminary Results [Text] / H. Tanaka, T. Toyoshima, I. Atsuta [et al.] // Implant Dent. –2015. –Vol. 24, №6. –P. 669-674.

290. Torreggiani, E. Exosomes: novel effectors of human platelet lysate activity [Text] / E. Torreggiani, F. Perut, L. Roncuzzi [et al.] // *Eur Cell Mater.* –2014. –№ 28. –P. 137-151; discussion 151.

291. Trappenburg, M.C. Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia [Text] / M.C. Trappenburg, M. van Schilfgaarde, M. Marchetti [et al.] // *Haematologica.* –2009. –Vol. 94, № 7. –P. 911-918.

292. Trojahn Kølle, S.F. Pooled human platelet lysate versus fetal bovine serum-investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells intended for clinical use [Text] / S.F. Trojahn Kølle, R.S. Oliveri, P.V. Glovinski [et al.] // *Cytherapy.* –2013. –Vol. 15, № 9. –P. 1086-1097.

293. Tsay, R.C. Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites [Text] / R.C. Tsay, J. Vo, A. Burke // *Oral Maxillofac Surg.* –2005. –Vol. 63, № 4. –P. 521-528.

294. Tyml, K. Vitamin C and microvascular dysfunction in systemic inflammation [Text] / K. Tyml // *Antioxidants (Basel).* –2017. –Vol. 6, № 3. –P. 49.

295. Vagdatli, E. Effects of Electromagnetic Fields on Automated Blood Cell Measurements [Text] / E. Vagdatli, V. Konstandinidou, N. Adrianakis [et al.] // *J Lab Autom.* –2014. –Vol. 19, № 4. –362-365.

296. Vaishnavi, C. Treatment of endodontically induced periapical lesions using hydroxyapatite, platelet-rich plasma, and a combination of both: An in vivo study [Text] / C. Vaishnavi, B. Mohan, L.L. Narayanan // *J Conserv Dent.* –2011. –Vol. 14, № 2. –P. 140-146.

297. van der Bijl, I. Allogeneic platelet-rich plasma (PRP) is superior to platelets or plasma alone in stimulating fibroblast proliferation and migration, angiogenesis, and chemotaxis as relevant processes for wound healing [Text] / I. van der Bijl, M. Vlig, E. Middelkoop [et al.] // *Transfusion.* –2019. –Vol. 59, №11. –P. 3492-3500.

298. van Nispen tot Pannerden, H. The platelet interior revisited: electron tomography reveals tubular alpha-granule subtypes [Text] / H. van Nispen tot Pannerden, F. de Haas, W. Geerts [et al.] // *Blood*. –2010. –Vol.116, №7. –P. 1147-1156.

299. Villeneuve, J. Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in platelets and megakaryocytes: a novel organization for these secreted proteins [Text] / J. Villeneuve, A. Block, M.C. Le Bousse-Kerdiles [et al.] // *Exp Hematol*. –2009. –Vol. 37, № 7. –P. 849-856.

300. Wang, C. Preparation of a new composite combining strengthened  $\beta$ -tricalcium phosphate with platelet-rich plasma as a potential scaffold for the repair of bone defects [Text] / C. Wang, D. Zhong, X. Zhou [et al.] // *Exp Ther Med*. –2014. –Vol. 8, № 4. –P. 1081-1086.

301. Wang, Z. Emerging roles of PDGF-D signaling pathway in tumor development and progression [Text] / Z. Wang, A. Ahmad, Y Li. [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. –2010. –Vol. 1806, № 1. –P. 122-130.

302. Wang, D. Construction of tissue-engineered bone using a bioreactor and platelet-rich plasma [Text] / D. Wang, H. Jiang, S. Wang [et al.] // *Exp Ther Med*. –2014. –Vol. 8, № 2. –P. 413-418.

303. Welsh, J.D. Hierarchical organization of the hemostatic response to penetrating injuries in the mouse macrovasculature [Text] / J.D. Welsh, I. Poventud-Fuentes, S. Sampietro [et al.] // *J Thromb Haemost*. –2017. –Vol. 15. –P. 526

304. Werner, B.C. An Analysis of Current Treatment Trends in Platelet-Rich Plasma Therapy in the Medicare Database [Text] / B.C. Werner, J.M. Cancienne, R. Browning [et al.] // *Orthop J Sports Med*. –2020. –Vol. 8, №2.–P. 2325967119900811.

305. White J.G. Electron microscopy methods for studying platelet structure and function [Text] / J.G. White // *Methods Mol Biol*. –2004. –№ 272. –P. 47-63.

306. Ye, T. The key events of thrombus formation: platelet adhesion and aggregation [Text] / T. Ye, H. Shi, N. Phan-Thien [et al.] // *Biomech Model Mechanobiol*. –2020. –Vol.19, № 3. –P. 943-955.

307. Yoshida, K. Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. [Text] / K. Yoshida, Y. Sumita, E. Marukawa [et al.] // Biomed Mater Eng. –2013. –Vol. 23, № 3. –P. 163-172.

308. Yoshimoto, Y. Ultrastructural characterization of surface-induced platelet activation on artificial materials by transmission electron microscopy [Text] / Y. Yoshimoto, T. Hasebe, K. Takahashi [et al.] // Microsc Res Tech. –2013. –Vol. 76, № 4. –P. 342-349.

309. Yun, J.H. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: preliminary study in canine three-wall intrabony defects [Text] / J.H. Yun, S.H. Han, S.H. Choi // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. –2014. –Vol. 102, № 5. –P. 1021-1030.

310. Zhang, H. Tetramethylpyrazine Inhibits Platelet Adhesion and Inflammatory Response in Vascular Endothelial Cells by Inhibiting P38 MAPK and NF-kappa B Signaling Pathways [Text] / H. Zhang, W. Tang, S. Wang [et al.] // Inflammation. –2020. –Vol.43,№1. –P.286-297.

311. Zhevago, N.A. Polychromatic light (480-3400nm) similar to the terrestrial solar spectrum without its UV component in post-surgical immunorehabilitation of breast cancer patients [Text] / N.A. Zhevago, A.A. Zimin, T.V. Glazanova [et al.] // J Photochem Photobiol B. –2017. –Vol.166. –P. 44-51.

312. Zhong, D. In vivo ossification of a scaffold combining  $\beta$ -tricalcium phosphate and platelet-rich plasma [Text] / D. Zhong, C.G. Wang, K. Yin [et al.] // Exp Ther Med. –2014. –Vol. 8, № 5. –P. 1381-1388.

313. Zhu, M.T. Particokinetics and extrapulmonary translocation of intratracheally instilled ferric oxide nanoparticles in rats and the potential health risk assessment [Text] / M.T. Zhu, W.Y. Feng, Y. Wang [et al.] // Toxicol. Sci. –2009. –Vol. 107, № 2. –P. 342-351.

314. Zhu, Y. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review [Text] / Y. Zhu, M. Yuan, H.Y. Meng [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. –2013. –№ 21. –P. 1627-1637.