

REFERENCES

1. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005; 19 (2): 111—23.
2. Miller C.H., Rice A.S., Garrett K., Stein S.F. Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *Br. J. Haematol.* 2014; 165 (6): 842—53.
3. Hung J., Lam J.Y., Lacoste L., Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation.* 1995; 92 (9): 2432—6.
4. Varani K., Portaluppi F., Gessi S., Merighi S., Ongini E., Belardinelli L. et al. Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A_{2A} receptors: functional and biochemical aspects. *Circulation.* 2000; 102 (3): 285—9.
5. Velik-Salchner C., Maier S., Innerhofer P., Streif W., Klingler A., Kolbitsch C. et al. Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: The results of a pilot study. *Anesth. Analg.* 2008; 107 (6): 1798—806.
6. Fraser C.G. *Biological Variations from Principles to Practice.* Washington: AACC press; 2001.
7. Ricós C., Alvarez V., Cava F., García-Lario J.V., Klingler A., Kolbitsch C. et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1999; 59 (7): 491—500.
8. Sandberg S., Fraser C.G., Horvath A.R., Jansen R., Jones G., Oosterhuis W. et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2015; 53 (6): 833—5.
9. Otahbachi M., Simoni J., Simoni G., Moeller J.F., Cevik C., Meyerrose G.E. et al. Gender differences in platelet aggregation in healthy individuals. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2010; 30 (2): 184—91.
10. Ol'khovskiy I.A., Stolyar M.A. Criteria for aspirin resistance in the impedance test for platelet aggregation. *Kardioangiologiya i revmatologiya.* 2013; (1): 8—12. (in Russian)
11. Seyfert U.T., Haubelt H., Vogt A., Hellstern P. Variables influencing Multiplate (TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets.* 2007; 18 (3): 199—206.
12. The National Society of Hematology. Federal guidelines for the diagnosis and treatment of von Willebrand disease. Moscow; 2013. (in Russian)
13. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation from 20.12.2012 № 1237н. On approval of the standard of primary health care for children with hemophilia A, hemophilia B, von Willebrand disease, rare hemorrhagic coagulopathy and thrombocytopeny, prothrombotic states planned primary diagnosis (Registered in the Ministry of Justice of Russia 06.03.2013 N 27538). Moscow; 2013. (in Russian)
14. Cattaneo M., Cerletti C., Harrison P., Hayward M., Kenny D., Nugent D. et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 1183—9.
15. Serebruany V.L., McKenzie M.E., Meister A.F., Fuzaylova S.Y., Gurbel P., Atar D. et al. Whole blood impedance aggregometry for the assessment of platelet function in patients with congestive heart failure (EPCOT Trial). *Eur. J. Heart Fail.* 2002; 4 (4): 461—7.

Received 15.12.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 612.111.7.083

Горохова В.С.¹, Черновол П.А.², Черновол В.П.², Сулаева О.Н.³

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ОТВЕТА ТРОМБОЦИТОВ НА АДФ: ОТ ТЕОРИИ ТРОМБОГЕНЕЗА К ПРАКТИЧЕСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ БОГАТОЙ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМЫ

¹Клинико-диагностическая лаборатория, ФК «Металлург», 83029, Донецк; ²«Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца» Минздрава Украины, 01601, Киев; ³«Запорожский государственный медицинский университет» Минздрава Украины, 69035, Запорожье

Для оценки вариабельности морфогенетического потенциала плазмы, богатой тромбоцитами, был проведен анализ АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, выделенных из крови 32 добровольцев-мужчин в возрасте от 18 до 42 (22 ± 3) лет. Выявлен бимодальный характер реакции тромбоцитов на АДФ с пиками агрегации в диапазоне 30—50% и 60—80%. Помимо индивидуальных различий в амплитуде агрегации, выявлены различия во времени достижения пика агрегации и выхода на плато. У части добровольцев зафиксирован обратимый характер агрегационной кривой, отражающий отсутствие фазы стабилизации тромбогенеза. Характеристики агрегационных кривых, ассоциированные с активацией сигнальных систем, запуском дегрануляции тромбоцитов и экспозиции GPIIb/IIIa, могут отражать скорость и эффективность секреции гранул тромбоцитов при использовании стандартных доз стимуляторов агрегации. Это обосновывает необходимость предварительной оценки агрегационного ответа тромбоцитов для прогнозирования эффективности дегрануляции и высвобождения из гранул тромбоцитов биологически активных молекул, определяющих морфогенетический потенциал плазмы, богатой тромбоцитами.

Ключевые слова: тромбоциты; агрегация; плазма, богатая тромбоцитами; морфогенетический эффект.

Для цитирования: Горохова В.С., Черновол П.А., Черновол В.П., Сулаева О.Н. Вариабельность ответа тромбоцитов на АДФ: от теории тромбогенеза к практическому применению богатой тромбоцитами плазмы. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (6): 363-367. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-6-363-367

Gorokhova V.S.¹, Chernovol P.A.², Chernovol V.P.², Sulaeva O.N.³

THE VARIABILITY OF RESPONSE OF THROMBOCYTES TO ADP: FROM THEORY OF THROMBOGENESIS TO PRACTICAL APPLICATION OF PLASMA RICH IN THROMBOCYTES

Для корреспонденции: Сулаева Оксана Николаевна, д-р мед. наук, проф., Запорожский государственный медицинский университет, 69035, Запорожье, Украина. e-mail: oksana.sulaeva@gmail.com

¹The clinical diagnostic laboratory of FC "Metallurg", 83029 Donetsk; ²The A.A. Bogomolets National medical university of Minzdrav of Ukraine, 01601 Kiev, Ukraine; ³The Zaporozhskii state medical university of Minzdrav of Ukraine, Zaporozhje, Ukraine

The study was carried out to evaluate variability of morpho-genetic potential of plasma rich in thrombocytes. The analysis of ADP-induced aggregation of thrombocytes separated from blood samples of 32 male volunteers aged 18-42 (22±3) was applied. The bimodal character of reaction of thrombocytes to ADP with peaks of aggregation in range of 30-50% and 60-80%. Besides individual differences in range of aggregation differences in time of reaching peak of aggregation and entering plateau were established. In some of volunteers the reversible character of aggregation curve reflecting absence of phase of thrombogenesis stabilization was established. The characteristics of aggregation curve, associated with activation of signal system, launching of degranulation of thrombocytes and exposition of GPIIb/IIIa can reflect velocity and effectiveness of secretion of granules of thrombocytes at application of standard doses of stimulants of aggregation. These specifics substantiate necessity of preliminary evaluation of aggregation response of thrombocytes for prognosis of effectiveness of degranulation and release out of granules of thrombocytes biologically active molecules determining morpho-genetic potential of plasma rich with thrombocytes.

Key words: thrombocytes; aggregation; plasma rich with thrombocytes; morpho-genetic effect.

For citation: Gorokhova V.S., Chernovol P.A., Chernovol V.P., Sulaieva O.N. The variability of response of thrombocytes to ADP: from theory of thrombogenesis to practical application of plasma rich in thrombocytes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (6): 363-367. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-6-363-367

For correspondence: Sulaieva O.N., doctor of medical sciences, professor. e-mail: oksana.sulaieva@gmail.com

Information about authors:

Sulaieva O.N. <http://orcid.org/0000-0002-9614-4652>

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Financing. The study had no sponsor support

Received 01.11.2015
Accepted 15.12.2015

Введение. Как известно, тромбоциты (Тц) не только вовлечены в тромбогенез и работу коагуляционной системы плазмы крови, но также регулируют процессы воспаления и регенерации [1—3]. Благодаря этому Тц на сегодня считаются оптимальной моделью для диагностики, прогнозирования и оценки эффективности лечения пациентов с сердечно-сосудистой патологией [4]. Не менее важным, с практической точки зрения, является и мощный морфогенетический потенциал Тц, обусловленный аккумулярованием в них значительного количества факторов роста, стимулирующих репаративные процессы в зоне альтерации [3, 5]. Мощный морфогенетический потенциал Тц стал активно применяться в регенеративной медицине, примером чему является использование плазмы или гелей, богатых Тц, в дерматологии, косметологии, стоматологии, травматологии, гастроэнтерологии, хирургии и других областях медицины [3, 5, 6]. Условием реализации морфогенетического потенциала Тц является их активация и агрегация, сопровождаемые дегрануляцией и высвобождением факторов роста и биологически активных веществ [1, 4, 7, 8]. При этом исследователи редко задаются вопросами о том, насколько гомогенна агрегационная активность Тц и всегда ли использование богатой тромбоцитами плазмы (БТП) гарантирует реализацию морфогенетических эффектов Тц. Для ответа на данные вопросы было проведено пилотное исследование, направленное на анализ вариабельности функционального ответа Тц, сопряженного с дегрануляцией и высвобождением тромбоцитарных морфогенов.

Цель работы: оценить варианты различных параметров ответа Тц на классический стимулятор агрегации для оптимизации диагностики и трактовки индивидуальной реактивности Тц.

Материал и методы. В работе проведена оценка агрегационной способности Тц у 32 добровольцев — здоровых мужчин в возрасте от 18 до 42 (22 ± 3) лет. Критериями исключения были заболевания сердечно-сосудистой системы, печени, почек, патология системы гемостаза, острые воспалительные заболевания, прием лекарственных препаратов.

Забор крови производили утром натощак из локтевой вены с использованием системы S-Monovette, SARSTEDT (Германия). Получение БТП и бедной тромбоцитами плазмы осуществлялось стандартным методом с использованием центрифуги Labofuge 200 (Германия). Измерение агрегации Тц осуществляли спектрофотометрическим методом на агрегометре РМ-2110 SOLAR (Беларусь). В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (Ренам, РФ) в конечной концентрации 0,4 мкМ. Исследование агрегации Тц проводили согласно методике, изложенной в инструкции к аппарату [9]. При оценке результатов агрегометрии учитывались степень и скорость агрегации, количество Тц, время достижения пика агрегации. Статистическую обработку данных проводили в пакете MedCalc. Все данные приведены в виде медианы (*Me*) ± ошибка медианы (*m*) и 95% доверительный интервал (ДИ).

Результаты исследования. Оценка параметров агрегации Тц у здоровых обследуемых позволила выявить ряд интересных фактов. Во-первых, несмотря на то, что степень агрегации Тц по выборке была в рамках референсных значений (табл. 1), распределение признака имело бимодальный характер (рис. 1) с пиками в диапазоне 30—50 и 60—80%. Параметры агрегации Тц не зависели от пола и возраста обследуемых, не были связаны с количеством Тц в БТП. При

Таблица 1

Показатели агрегации Тц, индуцированной АДФ, у здоровых волонтеров

Показатель	<i>Me</i> ± <i>m</i>	95% ДИ	Минимум	Максимум
Степень агрегации, %	43,7 ± 3,48	36,6—50,2	8,90	95,4
Скорость агрегации	52,8 ± 3,71	47,1—60,1	19,0	114,8
Время, с	179,0 ± 21,5	73,0—262,4	24,0	417,0
Количество Тц	252,1 ± 6,92	236,6—262,8	173,8	354,5

Содержимое гранул тромбоцита

Виды гранул	Класс веществ	Содержимое
Плотные гранулы		
Матрикс	Проагреганты	АДФ, АТФ, ГДФ, ГТФ
	Регуляторы	Серотонин, гистамин
	Ионы	Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Мембрана гранул	Рецепторы	CD62P, Гликопротеины GP Ib и GP IIb/IIIa,
	Сигнальные молекулы	LAMP2, Src, Ral-1
α-Гранулы		
Матрикс	Адгезионные глико-протеины	Фибронектин, витронектин, фактор Виллебранда, тромбоспондин
	Хемоаттрактанты	Тромбоцитарный фактор 4, Гликопротеин богатый гистидином, PBT — Основной белок тромбоцитов, СТАР-III — Белок, активирующий соединительную ткань, NAP-2 — Нейтрофил-активирующий пептид
	Митогены	Фактор роста тромбоцитарного происхождения (PDGF), Трансформирующий фактор роста (TGFB), эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и др.
	Ингибиторы протеаз	Ингибитор тканевого фактора (TFPI), Ингибитор активатора плазминогена (PAI-1), Тромбоцитарный ингибитор коллагеназы (PDCI), 2-антиплазмин, C1 ингибитор, α ₂ -антитрипсин, α ₂ -макроглобулин
	Коагулянты	Факторы V, XI, XIII, Высокмолекулярный кининоген (HMWK), фибриноген, белок С, белок S, ингибитор белка С, Тромбоспондин (TSP-1, TSP-2)
Мембрана	Молекулы адгезии	CD9, CD31, CD36, CD62P, CD144 = GLUT-3 Рецепторы GP IV, P-селектин
Лизосомы		
Матрикс	Кислые протеазы	Катепсины D и E Карбоксипептидазы А и В, коллагеназа, кислая фосфатаза, арилсульфатаза
	Глико-гидролазы	Гепариназа, β-галактозидаза, β-глюкуронидаза, β-N-ацетил-глюкозаминидаза, β-глицерофосфатаза, глюкозидазы, фукозидазы α-L-рабинозидаза, α-D-маннозидаза
Мембрана	Интегральные белки	Интегральный белок лизосом (LIMP-1), ассоциированный с лизосомой мембранный белок (LAMP-1, 2)

этом был зафиксирована закономерная корреляционная связь между показателями степени и скорости агрегации ($r = 0,875$; $p < 0,001$). Кроме того, время достижения пика агрегации также широко варьировало, что было связано с наличием в ряде случаев продолжительного латентного периода и двух-фазного выхода на пик агрегации. Как правило, наличие латентного периода связывают со скоростью дегрануляции Тц и высвобождения вторичных ауто- и паракринных стимуляторов агрегации Тц из плотных гранул. Исходя из этого, можно предположить, что у здоровых обследуемых будут наблюдаться значительные вариации скорости и эффективности дегрануляции при использовании стандартных доз стимуляторов агрегации.

Третьей интересной находкой стала вариабельность формы агрегационных кривых. Наряду с нормальными типами агрегатограммы, вариантами гипо- и гиперагрегации были зафиксированы варианты обратимой агрегации при использовании стандартной концентрации АДФ (рис. 2). Данный вариант, по сути, отражает нарушение фазы стабилизации тромбогенеза, которая реализуется путем активации GPIIb/IIIa, обеспечивающей связь с фибриногеном и формирование «мостиков» между Тц в агрегате [3, 10]. Отчасти такой вариант может объясняться молодым возрастом волонтеров и наличием значимых резервных возможностей, лимитирующих тромбообразование за счет активации цАМФ- и eNOS-зависимых механизмов негативной регуляции тромбогенеза [4]. Однако данное предположение требует фактического подтверждения дальнейшими исследованиями.

Обсуждение. Обнаруженные нами случаи вариаций агрегационного ответа Тц на АДФ среди здоровых доноров, по сути, отражают проявления и роль индивидуальной реактивности, моделью реализации которой в данной работе были Тц [10]. В этом вопросе помимо сугубо теоретического анализа причин и механизмов реализации разных вариан-

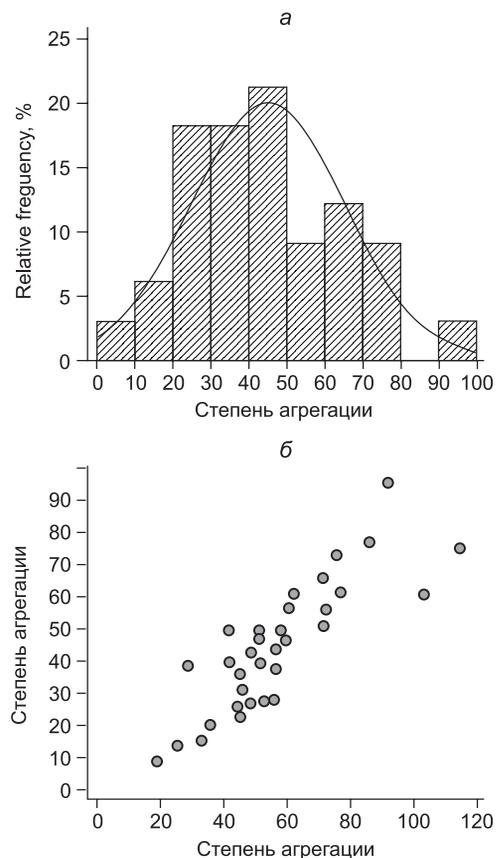


Рис. 1. Распределение показателя степени агрегации Тц, индуцированной АДФ (а), и его связь со скоростью агрегации у здоровых волонтеров (б).

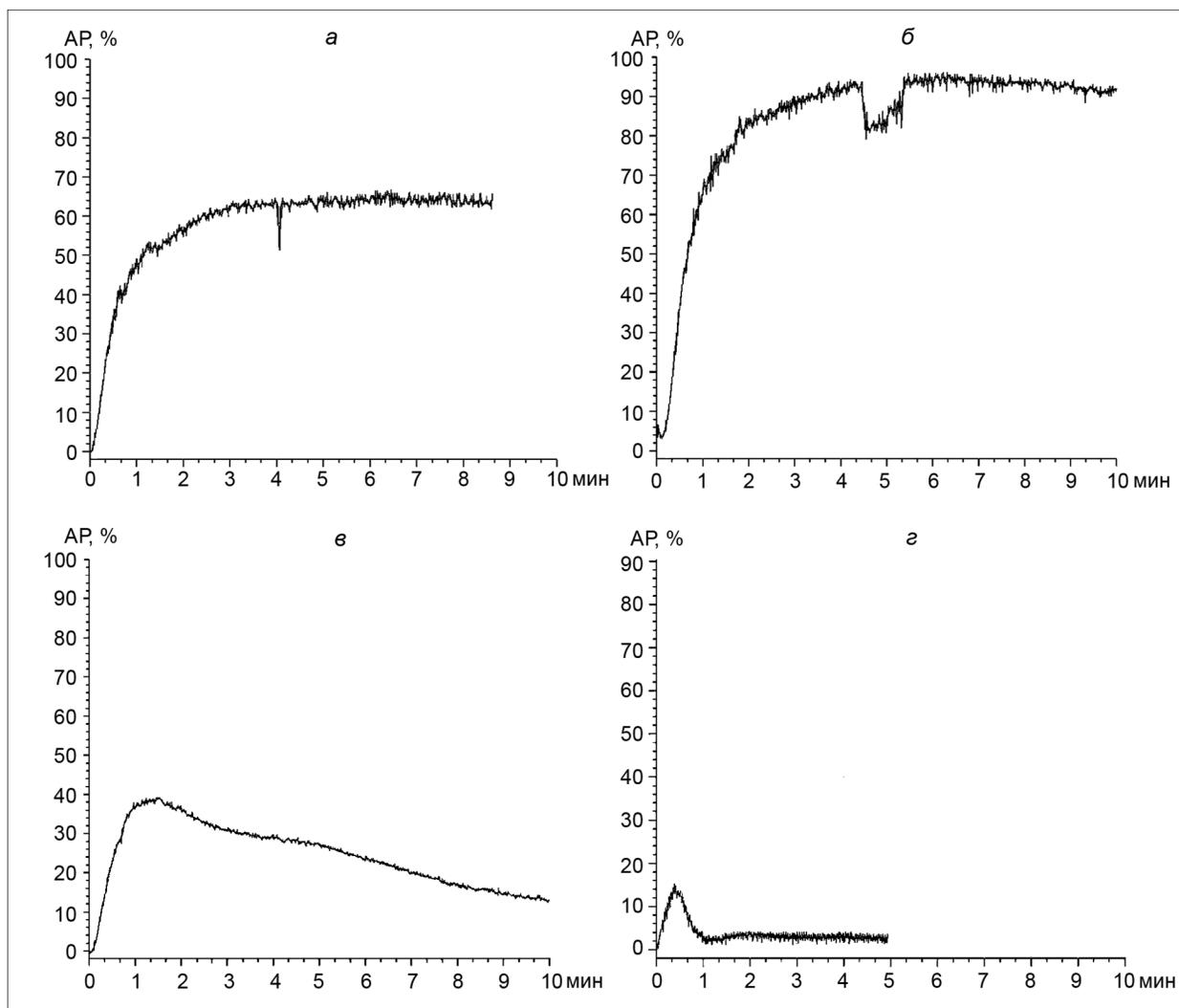


Рис. 2. Варианты агрегационных кривых при индукции Тц АДФ.

а — вариант нормальной кривой агрегационного ответа тромбоцитов на АДФ; *б* — пример гиперагрегации; *в* — обратимый вариант агрегации в ответ на АДФ; *г* — слабая обратимая агрегация тромбоцитов.

тов ответа на стимуляторы агрегации не менее важной является и практическая сторона — возможность и алгоритм оптимизации использования БТП [11, 12]. Эффекты применения БТП обусловлены свойствами активных Тц, которые являются носителями многочисленных регуляторов регенерации поврежденных тканей [10]. В цитоплазме Тц помимо митохондрий, пероксисом и включений гликогена находятся 3 вида гранул: α -гранулы, δ -гранулы и λ -гранулы (лизосомы) [4, 11]. В состав α -гранул входит более 30 различных белков, имеющих широкий спектр биологических эффектов, включая: а) регуляцию пролиферации; 2) модуляцию адгезии и хемотаксиса; 3) участие в реализации плазменного звена системы гемостаза; 4) вазоактивное действие; 5) иммунные и другие эффекты (табл. 2). Наиболее важное значение в терапевтических эффектах БТП, применяемой в регенеративной медицине и косметологии, имеют факторы роста, в том числе VEGF, стимулирующий ангиогенез, и PDGF — фактор роста тромбоцитарного происхождения, который обеспечивает репарацию сосудистой стенки и соединительной ткани, стимулирует рост гладкомышечных клеток сосудов и фибробластов, а также ускоряет производство гликозаминогликанов, коллагена и других элементов соединительной

ткани [2, 13, 14]. Активная секреция факторов роста и других молекул, входящих в состав гранул Тц, начинается в течение нескольких минут после активации Тц, и за 1 ч выделяется более 90% содержимого гранул Тц [13]. Поскольку механизмы агрегации и дегрануляции тесно сопряжены, снижение или пролонгирование агрегационного ответа предполагает возможность нарушения дегрануляции и высвобождения биологически активных веществ из Тц. Более того, концентрация и даже сам спектр освобождаемых из тромбоцитов стимуляторов и ингибиторов морфогенеза зависят от действия лекарственных препаратов, природы стимулирующего агента, его концентрации и активации различных подтипов рецепторов [11, 12]. Так, стимуляция тромбоцитов тромбином через PAR-1 сопровождается преимущественным высвобождением VEGF, тогда как действие тромбина через PAR-4 вызывает секрецию эндостатина, обладающего противоположным эффектом на ангиогенез [15]. Данные факты диктуют необходимость предварительной оценки агрегационных характеристик БТП перед ее клиническим применением с целью стимуляции регенераторных процессов.

Заключение. У здоровых лиц возможны разные варианты агрегационного ответа Тц на АДФ, различающиеся по ам-

плитуде, скорости, длительности латентного периода и обратимости. Предварительная оценка данных параметров может быть полезна при прогнозировании морфогенетических эффектов БТП.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 4—8, 12—15
см. REFERENCES)

1. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н. Молекулярные механизмы тромбогенеза. *Кардиология*. 2012; 52 (12): 45—56.
3. Ахмеров Р.Р. *Регенеративная медицина на основе аутологичной плазмы. Технология Plasmolifting*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
9. Инструкция к реагенту АДФ. Available at: <http://www.renam.ru/dokumentaciya/instrukcii/issledovanie-funkcii-trombocitov/instrukciya-po-ispolzovaniyu-adf-1mmol-l/view>.
10. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н., Твердохлеб Т.А. Пуриновые рецепторы и ассоциированные с ними сигнальные системы в регуляции функционирования тромбоцитов. *Кардиология*. 2014; 54 (2): 56—62.
11. Баринов Э.Ф., Сулаева О.Н. Роль пуриновых рецепторов тромбоцитов в регуляции гемостаза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; (11): 30—5.

Поступила 01.11.15

REFERENCES

1. Barinov E.F., Sulaeva O.N. Molecular mechanisms of thrombogenesis. *Kardiologiya*. 2012; 52 (12): 45—56. (in Russian)
2. Anitua E., Andia I., Ardanza B. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* 2004; 91: 4—15.
3. Akhmerov R.R. *Regenerative Medicine Using Autoplasm. Plasmolifting technology [Regenerativnaya meditsina na osnove autologichnoy plazmy. Tekhnologiya Plasmolifting]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014. (in Russian)

4. Brass L. Understanding and evaluating platelet function. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2010; 2010: 387—96.
5. Arnoczky S.P., Caballero O., Yeni Y.N. Platelet-rich plasma to augmented connective tissue healing: making sense of it all. *J. Am. Acad. Orthopaed. Surg.* 2010; 18 (7): 445—8.
6. Jonnalagadda D., Izu L.T., Whiteheart S.W. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood*. 2012; 120 (26): 5209—16.
7. Xu F.T., Li H.M., Yin Q.S. Effect of activated autologous platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. *Am. J. Transl. Res.* 2015; 7 (2): 257—70.
8. Etulain J., Fondevila C., Negrotto S., Schattner M. Platelet-mediated angiogenesis is independent of VEGF and fully inhibited by aspirin. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 170 (2): 255—65.
9. Guide to the ADP reagent. Available at: <http://www.renam.ru/dokumentaciya/instrukcii/issledovanie-funkcii-trombocitov/instrukciya-po-ispolzovaniyu-adf-1mmol-l/view>. (in Russian)
10. Barinov E.F., Sulaeva O.N., Tverdokhle T.A. The role of protein kinase a in violation of platelet aggregation among patients with gastroduodenal ulcer bleeding. *Kardiologiya*. 2014; 54 (2): 56—62. (in Russian)
11. Barinov E.F., Sulaeva O.N. The role of purine receptors in regulation of hemostasis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; (11): 30—5. (in Russian)
12. Eppley B.L., Woodell J.E., Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2004; 114 (6): 1502—8.
13. Cobos Campos R., Parraza Diez N., Aizpuru Barandiaran F. Platelet-rich plasma in skin ulcer treatment. *Wounds*. 2013; 25 (9): 256—62.
14. Shani S., Ahmad R.E., Naveen S.V., Murali M.R., Puvanan K., Abbas A.A. et al. Platelet rich concentrate promotes early cellular proliferation and multiple lineage differentiation of human mesenchymal stromal cells in vitro. *Scientific World Journal*. 2014; 2014: 845293.
15. Ma L., Perini R., McKnight W., Dickey M., Klein A., Hollenberg M.D. et al. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2005; 102 (1): 216—20.

Received 01.11.15