УДК: 615.071, 612.13 DOI: 10.24412/2075-4094-2022-6-3-4 EDN JQDALU **

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Р.В. САВЕЛЬЕВ, С.В. СКУПНЕВСКИЙ

ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова», ул. Ватутина, д. 44-46, г. Владикавказ, Республика Северная Осетия-Алания, 362025, Россия, e-mail: 23rodion18@gmail.com

Аннотация. ***Введение***. Изучение клеточного звена системы гемостаза является актуальным, поскольку способствует снижению рисков тромбообразования или внутренних кровоизлияний. Внедрение подходов, позволяющих в клинических условиях подбирать оптимальные дозировки лекарственных веществ, влияющих на коагуляционные свойства крови, может повысить эффективность проводимой терапии. ***Цель исследования*** – разработать метод визуализации активации тромбоцитов, инициированной серотонина адипинатом в условиях *in vitro*, при помощи флуоресцентной микроскопии. ***Материалы и методы исследования.*** Объектом исследования служила венозная кровь, стабилизированная гепарином. В режиме *ex tempore* кровь центрифугировали 5 минут при 1000 об./мин, обогащённую тромбоцитами плазму помещали в лунки микропланшета, приливали раствор серотонина адипината в концентрациях: $48{,}8\times10^{-6}$ и $48{,}8\times10^{-3}$ мг/мл и окрашивали водным раствором акридинового оранжевого и тоипафлавина. Процесс активации клеток визуализировали под покровным стеклом на микроскопе *EVOS M*7000 (в режиме *GFP* – голубой свет). ***Результаты и их обсуждение***. Использование флуоресцентных красителей – трипафлавина и акридинового оранжевого, позволило изучить процесс активации тромбоцитов в условиях воздействия раствора серотонина адипината в динамике и количественно оценить размеры конечных агрегатов. Подобранные условия эксперимента – *pH* среды и концентрация красителей не оказывают влияния на физиологическое состояние кровяных пластинок в контроле. ***Выводы***. Разработанный метод визуализации тромбообразования является удобным, экспрессным и может быть рекомендован к внедрению в клинико-лабораторную практику для оценки воздействия фармакологических препаратов с гемостатическим эффектом.

Ключевые слова: активация тромбоцитов, витальное окрашивание клеток, риски тромбообразования, серотонина адипинат, флуоресцентная микроскопия.

IN VITRO VISUALIZATION OF PLATELETS ACTIVATION USING FLUORESCENCE MICROSCOPY

R.V. SAVELJEV, S.V. SKUPNEVSKIY

FSBEI HE "North Ossetian State University", Vatutina Str., 44-46, Vladikavkaz, Republic of North Ossetia-Alania, 362025, Russia, e-mail: 23rodion18@gmail.com

Abstract. ***Introduction***. The studying of the cellular link of the hemostasis system is relevant, since it allows to reduce the risks of thrombosis or internal hemorrhages. The introduction of approaches that allow in clinical conditions to select the optimal dosages of drugs that affect the coagulation properties of blood can increase the effectiveness of the therapy. ***The aim*** of the work is to develop a method for visualizing platelet aggregation initiated by serotonin adipinate under *in vitro* conditions using fluorescence microscopy. ***Materials and methods***. The object of the study was venous blood stabilized with heparin. In the *ex tempore* mode, blood was centrifuged for 5 minutes at 1000 rpm, platelet-rich plasma was placed in the wells of a microplate, and a solution of serotonin adipinate was added at concentrations of 48.8*10-6 and 48.8*10-3 mg/ml. The process of cell activation was visualized under a cover glass on an EVOS M7000 microscope (in GFP mode - blue light). ***Results***. The use of fluorescent dyes - tripaflavin and acridine orange, made it possible to study the process of platelet activation under the influence of a solution of serotonin adipinate in dynamics and to quantify the size of the final aggregates. The selected experimental conditions - the pH of the medium and the concentration of dyes do not affect the physiological state of platelets. ***Conclusions***. The developed method of visualization of thrombus formation is convenient, rapid and can be recommended for implementation in clinical and laboratory practice to assess the impact of pharmacological drugs with a hemostatic effect.

Key words: platelet activation, vital cell staining, risks of thrombosis, serotonin adipate, fluorescence microscopy.

Введение. Для профилактики инсультов, инфарктов и др. последствий тромбоэмболии, широкое распространение получила антитромбоцитарная и антикоагулянтная терапия. Однако, у отдельных групп пациентов это может приводить к развитию гастроинтестинальных кровотечений [2], а в случае необходимости оказания экстренной и неотложной помощи лицам, принимающим антикоагулянты с продолжительным клиренсом, внутреннее кровотечение, вызванное хирургическим вмешательством, может представлять угрозу для жизни. В этой связи актуален подбор индивидуальных схем коррекции гемостаза, а разработка удобных и практических методов оценки состояния клеточного звена этой системы будет способствовать снижению рисков осложнений.

В качестве удобной модели для изучения процесса активации тромбоцитов нами использован серотонин, раствор для инъекций которого применяется как гемостатическое, серотонинергическое и антидиуретическое средство [6]. При сорбции серотонина тромбоцитами происходит их активация, и запускается целый каскад биохимических реакций, приводящих к свертыванию крови [4]. Таким образом, пациентам с острым тромбозом артерий и вен, а также с заболеваниями, сопровождающимися гиперкоагуляцией, такие как ДВС-синдром [1], этот препарат противопоказан.

К настоящему времени описаны различные методы изучения активации тромбоцитов, одним из которых является проточная цитометрия [5]. Недостатком данного метода выступает то обстоятельство, что у оператора во время исследования отсутствует возможность наблюдать процесс в динамике, а это в ряде случаев может иметь принципиальный характер.

Цель исследования – разработать эффективный метод визуализации процесса активации тромбоцитов в условиях *in vitro* при помощи флуоресцентной микроскопии.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на цельной крови, отобранной у условно здоровых доноров, заранее давших информированное согласие. Биоматериал стабилизировали гепарином (подобранный антикоагулянт использовался с целью моделирования ситуации применения низкомолекулярных гепаринов, как профилактики осложнений от *SARS-CoV-2*). Суспензию тромбоцитов выделяли центрифугированием при 1000 об./мин. в течение 5 минут, а инициализацию процесса агрегации осуществляли в лунках микропланшета (соотношение плазмы и препарата 10:1). Раствор серотонина адипината готовили в следующих концентрациях $48{,}8\times10^{-6}$ мг/мл и $48{,}8\times10^{-3}$ мг/мл, растворитель – *фосфатно-солевой буфер* (ФСБ) с *pH*=7,4. Для визуализации процесса образования тромбоцитарных агрегатов использовали микроскоп *INVITROGEN EVOS M7000* от *Thermo Fisher Scientific* и метод витального окрашивания акридиновым оранжевым и трипафлавином [3]; рабочий раствор готовили из сухой навески и ФСБ в соотношении 1:1500 и 1:2000 соответственно. Пробы смотрели под покровным стеклом.

Результаты и их обсуждение. Экспериментально подобранные условия окраски флуоресцентными красителями позволили визуализировать процесс активации тромбоцитов под воздействием серотонина адипината. Введение в культуру биогенного амина сопровождалось опалесценцией тромбоцитов, цвет которой варьировал от белого до светло-жёлтого. Интенсивность опалесценции и дальнейшее образование агрегатов носило дозозависимый характер (рис.).

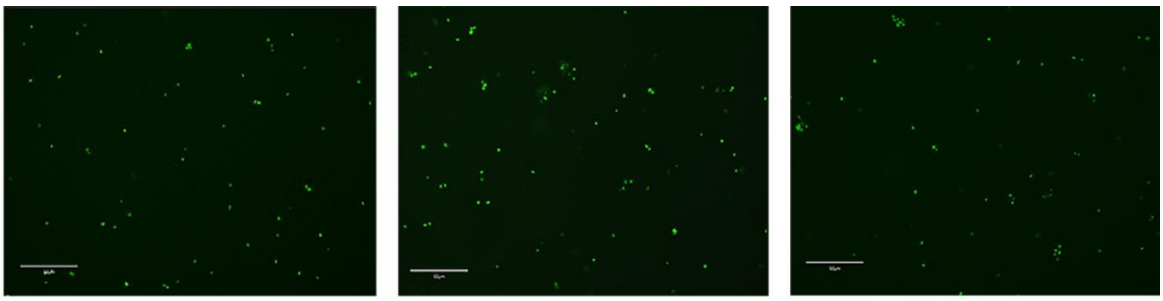

Рис. Микрофотографии тромбоцитов и их агрегатов при введении в культуру различных концентраций серотонина адипината (увеличение ×400, возбуждающее излучение – *GFP* – голубой лазер, длина линейки 50 мкм)

Как видно из рисунка, в контрольной группе тромбоциты находились на протяжении всего эксперимента (20 мин.) в ресуспендированном состоянии. В культуре наблюдались лишь редкие тромбоцитарные скопления, средние размеры которых не превышали 5,5 мкм. В образцах с серотонином в минимальной концентрации была замечена слабая опалесценция, и выявлялось частое образование клеточных агрегатов, доходящих в своих размерах до 9,4 мкм, однако большая часть клеток продолжала находиться в изолированном виде. В максимальной концентрации опалесценция плазмы была интенсивнее, и количество одиночных тромбоцитов значительно сократилось, а размеры агрегатов увеличились до 10,7 мкм.

Заключение. Представленный метод оценки активации тромбоцитов может быть рекомендован для внедрения в клинико-лабораторную диагностику, поскольку он обладает высокой информативностью, наглядностью и экспрессностью. Установлено, что используемые красители – акридиновый оранжевый и трипафлавин в фосфатно-солевом буфере, не влияют на физиологическое состояние кровяных пластинок. По результатам исследования выявлено, что с повышением концентрации серотонина адипината размеры тромбоцитарных агрегатов увеличивались в среднем на 12,15%. Разработанная методика может лечь в основу биофармацевтического скрининга при изучении новых лекарственных средств, влияющих на гемостаз.

Литература

1. Дуткевич И.Г. Синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания крови (ДВС-синдром) в хирургической практике // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. 2013. Т. 172, №2. С. 067–073. DOI: 10.24884/0042-4625-2013-172-2-067-073
2. Ливзан М.А., Ширинская Н.В. Гастроинтестинальные осложнения у пациентов, получающих антитромботическую и антикоагулянтную терапию // Consilium Medicum. 2019. Т. 21, №8. С. 71–73. DOI: 10.26442/20751753.2019.8.190531
3. Макаров М.С., Кобзева Е.Н., Высочин И.В., Воровкова Н.В., Хватов В.Б. Применение витального окрашивания для морфофункционального анализа тромбоцитов человека короткого хранения // Альманах клинической медицины. 2014. №30. С. 83–87. DOI: 10.18786/2072-0505-2014-30-83-87
4. Серебряная Н.Б., Шанин С.Н., Фомичева Е.Е., Якуцени П.П. Тромбоциты как активаторы и регуляторы воспалительных и иммунных реакций. Часть 1. основные характеристики тромбоцитов как воспалительных клеток // Медицинская иммунология. 2018. Vol. 20, №6. С. 785–796. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796
5. Сироткина О.В., Боганькова Н.А., Ласковец А.Б., Кухарчик Г.А., Гайковая Л.Б., Вавилова Т.В. Иммунологические методы в оценке функциональной активности тромбоцитов у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями // Медицинская иммунология. 2010. Т. 12, №3. С. 213–218. DOI: 10.15789/1563-0625-2010-3-213-218
6. Справочник лекарственных средств. URL: https://www.vidal.ru/drugs/serotonin-adipate

References

1. Dutkevich IG. Sindrom disseminirovannogo vnutrisosudistogo svjortyvanija krovi (DVS-sindrom) v hirurgicheskoj praktike [Disseminated intravascular clotting (DIC) syndrome in surgical practice]. Grekov's Bulletin of Surgery. 2013;172(2):067-73. DOI: 10.24884/0042-4625-2013-172-2-067-073. Russian.
2. Livzan MA, Shirinskaya NV. Gastrointestinal'nye oslozhnenija u pacientov, poluchajushhih antitromboticheskuju i antikoaguljantnuju terapiju [Gastrointestinal complications in patients receiving antiplatelet and anticoagulant therapy]. Consilium Medicum. 2019;21(8):71-3. DOI: 10.26442/20751753.2019.8.190531. Russian
3. Makarov MS, Kobzeva EN, Vysochin IV, Borovkova NV, Khvatov VB. Primenenie vital'-nogo okrashivanija dlja morfofunkcional'nogo analiza trombocitov cheloveka korotkogo hranenija [Use of vital staning in stored human platelets morphofunctional analysis]. Almanac of Clinical Medicine. 2014;30;83-7. DOI: 10.18786/2072-0505-2014-30-83-87. Russian.
4. Serebryanaya NB, Shanin SN, Fomicheva EE, Yakutseni PP. Trombocity kak aktivatory i reguljatory vospalitel'nyh i immunnyh reakcij [Blood platelets as activators and regulators of inflammatory and immune reactions]. Part 1.Basic characteristics of platelets as inflammatory cells. Medical Immunology. 2018;20(6):785-96. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-6-785-796. Russian.
5. Sirotkina OV, Bogan'kova NA, Laskovets AB, Kuharchik GA, Gaykovaya LB, Vavilova TV. Immunologicheskie metody v ocenke funkcional'noj aktivnosti trombocitov u bol'nyh s ser-dechno-sosudistymi zabolevanijami [Immunological methods forevaluation of platelet functions in the patiennts with cardiovascular diseases]. Medical Immunology. 2010;12(3):213-8. DOI: 10.15789/1563-0625-2010-3-213-218. Russian
6. Spravochnik lekarstvennyh sredstv [Directory of medicines]: https://www.vidal.ru/drugs/serotonin-adipate

Библиографическая ссылка:
Савельев Р.В., Скупневский С.В. Визуализация активации тромбоцитов в условиях *in vitro* методом флуоресцентной микроскопии // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2022. №6. Публикация 3-4. URL: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-6/3-4.pdf (дата обращения: 22.11.2022). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-6-3-4. EDN JQDALU*
Bibliographic reference:
Saveljev RV, Skupnevskiy SV. Vizualizacija aktivacii trombocitov v uslovijah in vitro metodom fluorescentnoj mikroskopii [*In vitro* visualization of platelets activation using fluorescence microscopy]. Journal of New Medical Technologies, e-edition. 2022 [cited 2022 Nov 22];6 [about 3 p.]. Russian. Available from: http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-6/3-4.pdf. DOI: 10.24412/2075-4094-2022-6-3-4. EDN JQDALU
* номера страниц смотреть после выхода полной версии журнала: URL: http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-6/e2022-6.pdf
**идентификатор для научных публикаций EDN (eLIBRARY Document Number) будет активен после выгрузки полной версии журнала в eLIBRARY