

УДК 616.151.5/618.5-07

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТРОМБОЦИТОВ В РОДАХ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

Шаталова Г.Ю., Бондарь Т.П., Муратова А.Ю.

ГОУ ВПО СГУ, Ставрополь, Россия, e-mail: shaposhnikov35@mail.ru

***Цель.** Изучить изменения морфометрических показателей тромбоцитов, полученных с помощью КЦТр у экспериментальных животных, в различные периоды родовой деятельности.*

***Материал и методы.** Влияние лекарственных препаратов изучалось на экспериментальных моделях, созданных на 30 беременных белых крысах линии Вистар в дородовом периоде, в период родов и раннем послеродовом периоде.*

***Результаты.** У беременных самок крыс, получавших метионин, отмечались сгущение крови и склонность к тромбозам, а у беременных самок крыс, получавших кардиоманил, отмечались клинические проявления тромбофилии, выраженные в склонности к кровоточивости.*

***Заключение.** Введение лабораторным животным лекарственных препаратов позволяет создать модели гипо- и гиперкоагуляции для выявления общих закономерностей с целью использования для оценки риска возникновения тромбоземоррагических осложнений у беременных и рожениц и поиска путей их устранения.*

***Ключевые слова:** тромбоцит, тромбоземоррагические нарушения, агрегация, лабораторное животное, модель гипокоагуляции, модель гиперкоагуляции.*

DYNAMICS OF CHANGE MORPHOMETRICAL INDICATORS THROMBOCYTES IN SORTS (EXPERIMENTAL RESEARCHES)

Shatalova G.U., Bondar T.P., Muratova A.U.

GOU VPO SGU, Stavropol, Russia, e-mail: shaposhnikov35@mail.ru

The purpose. To study changes morpho-metrical indicators activity thrombocytes at laboratory animals, received by means of КЦТр at experimental animals, during the various periods of patrimonial activity.

Material and methods. Influence of medical products was studied on the experimental models created on 30 pregnant white rats of line Wistar in the antenatal period, in sorts and the early postnatal period.

Results. At pregnant females of the rats receiving methionine, the condensation of blood and propensity to thromboses, and at pregnant females of the rats receiving cardiomagnil were marked, clinical displays thrombophilia, expressed in propensity to bleed were marked.

The conclusion. Introduction by a laboratory animal of medical products allows to create models hypo-and hypercoagulations for revealing of the general laws for the purpose of use for an estimation of risk of occurrence thrombo-haemorrhage complications at pregnant women and lying-in women and search of ways of their elimination.

Keywords: thrombocyte, thrombo-haemorrhage infringements, aggregation, laboratory animals, models hypo-and hypercoagulations.

Актуальность исследования. Гестозы и обусловленные ими акушерские кровотечения занимают одно из ведущих мест в структуре причин материнской смертности [Кулаков В.И.,

2004]. В норме система гемостаза находится в состоянии равновесия, обеспечиваемого слабой активацией коагуляционного каскада и противостоящей ей активностью естественной антикоагулянтной и фибринолитической систем, что предотвращает развитие спонтанных тромбозов [Сидельникова В.М., 2005]. Беременность сама по себе является состоянием, в 5–6 раз увеличивающим риск венозных тромбозов [Степанова А.А., 2009]. Даже при физиологически протекающей беременности, особенно в III триместре, наступает гиперкоагуляция, что в первую очередь связано с увеличением почти на 200% I, II, VIII, IX, X факторов свертывания крови в сочетании со снижением фибринолитической активности и естественной антикоагулянтной активности (антитромбин III, протеин S) [Лифенко Р.А., 2009]. Помимо этого, в III триместре скорость кровотока в венах нижних конечностей уменьшается наполовину, что обусловлено частично механической обструкцией беременной маткой венозного оттока, частично – снижением тонуса венозной стенки из-за гормональной перестройки организма во время беременности [Аржанова О.Н., 2000]. Таким образом, тенденция к стазу крови в сочетании с гиперкоагуляцией при физиологической беременности предрасполагает при неблагоприятных условиях к развитию тромбозов и тромбоэмболий. А при существующей тромбофилии (генетической и/или приобретенной) риск тромбоэмболических и акушерских осложнений во время беременности повышается в десятки раз [Мацакария А.Д., 2003].

Тромбофилические нарушения системы гемостаза являются одним из инициальных моментов развития таких осложнений беременности, как невынашивание, синдром потери плода, неудачи экстракорпорального оплодотворения, задержка внутриутробного развития плода, гестоз, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты [Мацакария А.Д., 2004; Preston F.E., 1999; Brenner B., 1999]. Частота невынашивания беременности составляет от 10 до 35% желанных беременностей [Сидельникова, 2002]. Среди причин невынашивания около 55–62% обусловлены дефектами коагуляционных протеинов или тромбоцитов [Мацакария А.Д., 2003, Bick R.L., 2006, Kitchens K.S., 2002]. Частота синдрома потери плода при АФС достигает 50–75% [Khamashta M.A., 2006].

Несмотря на актуальность проблемы, резервные возможности системы гемостаза матери и плода исследованы недостаточно. При этом отсутствие однозначных критериев оценки, невозможность проведения исследований на беременных женщинах, плодах и новорожденных детях послужили основанием для изучения изменения морфометрических показателей тромбоцитов (Тр) в родах и в эксперименте.

Целью исследования явилось изучение изменения морфометрических показателей Тр, полученных с помощью компьютерной цитометрии (КЦТр) в разные периоды родовой деятельности у экспериментальных животных.

Материалы и методы. Для достижения поставленных в исследовании задач были выбраны белые крысы линии Вистар. Было обследовано 30 беременных крыс. Из них – 3 взрослые небеременные самки, 9 – здоровых беременных самок с нормально протекающей беременностью, 9 – получавших кардиомагнил и 9 – получавших метионин. Исследования проводились за 1 сутки до родов, в день родов и через 5 дней после родов. Правомерность использования этих животных обусловлена наибольшим интересом к гемохориальной плацентации грызунов, как наиболее близкой к плацентации человека.

В качестве лекарственных препаратов, влияющих на морфометрические показатели тромбоцитов, были выбраны кардиомагнил и метионин. Основным механизмом антиагрегантного действия аспирина, входящего в состав кардиомагнила, заключается в ингибировании циклооксигеназы. Под влиянием этого фермента происходит превращение свободной арахидоновой кислоты в простагландиновые эндопероксиды, из которых потом образуются простагландины. При этом в тромбоцитах основным продуктом биосинтеза служит тромбоксан, являющийся сильным агрегантом тромбоцитов и оказывающий сосудосуживающее действие, в сосудистой стенке – простагландин P_{gI2}, который ингибирует агрегацию тромбоцитов и обладает сосудорасширяющим и коронарорасширяющим эффектами [Баркаган З.С., 1999]. Аспирин назначали в суточной дозе, рассчитанной в зависимости от массы животного (0,38–0,39 мг), после установления факта наличия беременности с нормальным суточным потреблением воды 30–32 мл.

В качестве препарата, способствующего микротромбообразованию и нарушению микроциркуляции, был выбран метионин, являющийся одной из незаменимых аминокислот. Продуктом превращения метионина является гомоцистеин, избыток которого накапливается в организме и обладает выраженным токсическим воздействием на клетку. При избытке гомоцистеина в организме основным местом его повреждающего воздействия становится внутренняя поверхность сосудов. Гипергомоцистеинемия приводит к повреждению и активации эндотелиальных клеток, выстилающих кровеносные сосуды, что значительно повышает развитие тромбозов. Кроме того, высокие уровни гомоцистеина усиливают агрегацию тромбоцитов вследствие снижения синтеза эндотелием релаксирующего фактора и NO [Арутюнян А.А., 2007; Муратова А.Ю., 2008]. Метионин назначали с учетом массы тела животного в дозе 0,6–0,7 мг, на фоне ограничения питьевого режима до 28–30 мл в сутки.

Белые крысы линии Вистар на 3–4 сутки после спаривания и установления наличия беременности известным способом получали кардиомагнил и метионин, растворенные в суточном объеме воды, в течение всей беременности. Кровь у животных брали из хвостовой вены. При работе с крысами полностью соблюдались международные принципы Хельсинкской декларации и гуманного отношения к животным.

Удобство такой модели состоит в том, что в лабораторных условиях на крысах могут контролироваться как эндогенные, так и экзогенные факторы, влияющие на течение беременности и условия содержания и кормления [Бондарева Н.И., 2008].

Наиболее полную информацию об особенностях патологических отклонений Тр на сегодняшний день можно получить, используя современные компьютерные технологии [Козинец Г.И., 2002; Муратова А.Ю., 2008].

Для исследования архитектоники Тр в мазках крови методом автоматизированной КЦТр в нашей работе использована компьютерная морфометрическая установка МЕКОС-Ц (ЗАО «Медицинские компьютерные системы», г. Москва) [Коробова Ф.В., 2001].

В нашей работе оценивались следующие основные морфометрические характеристики Тр: площадь клетки, средний диаметр, фактор формы, характеризующий образование псевдоподий, удельная оптическая плотность по зеленой компоненте, свидетельствующая о степени насыщенности Тр гранулами, т.е. об их функциональной активности, и доли синего и красного цвета в препарате.

Доли синего и красного цвета в препарате – цветояркие характеристики, отражающие интенсивность данного цвета по отношению ко всем остальным цветам. Они отражают возраст Тр. Увеличение доли синего цвета указывает на появление большого количества молодых форм Тр, доли красного цвета – более старых [Баркаган З.С., 1999]. Доля красного цвета отражает насыщенность Тр гранулами, поскольку при окраске азур-эозином их гранулы имеют фиолетово-красный цвет [Муратова А.Ю., 2008].

Для оценки «степени омоложения» Тр рассчитывался индекс омоложения Тр (ИОТр), т.е. отношение доли синего цвета в препарате к доле красного. По данным литературы, значения ИОТр у здоровых людей среднего возраста этот показатель составил 0,73–0,79 у.е. Повышение ИОТр свидетельствует об увеличении количества «молодых», активных форм Тр в периферической крови, снижение – об увеличении старых форм Тр [Козинец Г.И., 2002].

Для получения достоверной информации при исследовании Тр методом КЦТр происходит измерение не менее 500 клеток на один препарат [Муратова А.Ю., 2008].

Метод КЦТр позволяет получить объективные данные по сравнению с традиционным исследованием мазка, повышает информативность микроскопического исследования поверхности, формы и оптических свойств цитоплазмы Тр, что может служить важным диагностическим критерием при оценке состояния больного, выборе лечения, а также для коррекции антикоагулянтной терапии [Абасова Т.В., 2006].

Статистическую обработку данных в нашей работе проводили с использованием методов параметрического анализа и пакета Microsoft Excel. Определялись следующие статистические параметры: среднее (\bar{X}), ошибка среднего (m) и стандартное отклонение (δ). Достоверность

различия средних определяли по критерию Стьюдента (t) для коэффициентов вариации, уровень значимости p выбран менее 0,05.

Результаты и обсуждение. В результате статистического анализа полученных в эксперименте данных, у крыс в группах, выделенных в зависимости от принимаемого препарата, отмечено изменение длительности кровотечения. Так, отмечается увеличение длительности кровотечения на фоне применения кардиомагнила с 6 мин 50 сек до 8 мин 28 сек и уменьшение – на фоне применения метионина – до 5 мин 55 сек. При этом наиболее выраженные изменения отмечались в обеих группах экспериментальных животных в день родов и на первый день после родов (рисунок 1).

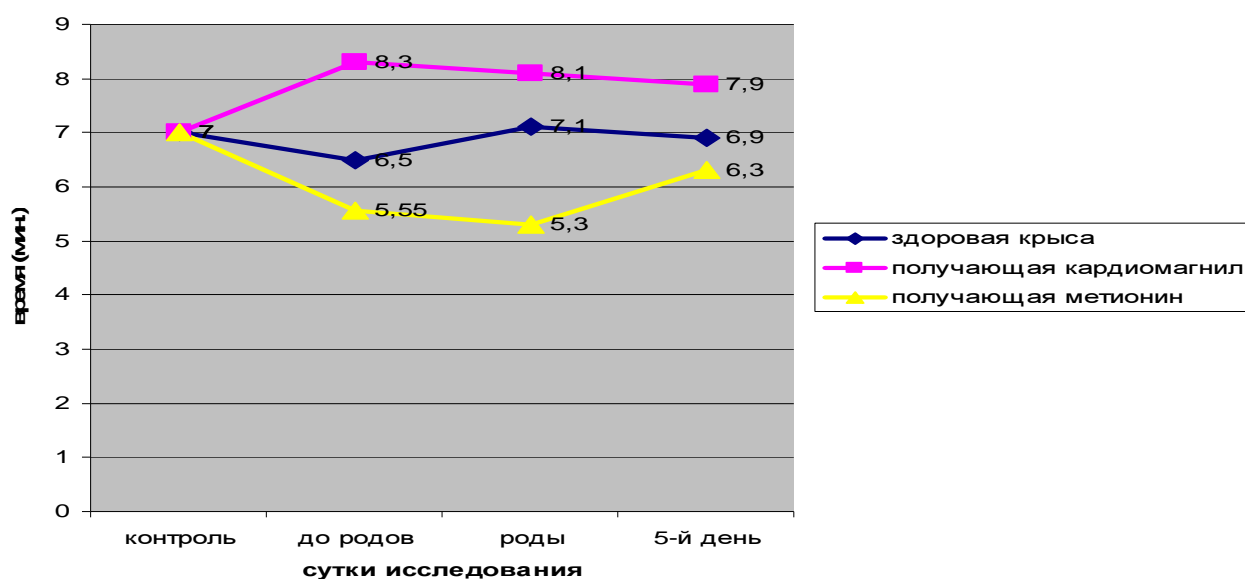


Рисунок 1. Длительность кровотечения самок крыс.

Длительность кровотечения увеличивается при применении кардиомагнила за счет угнетения функций тромбоцитов, что подтверждается показателями количества, объема и показателями агрегации Тр. При введении метионина происходят противоположные изменения.

Изменение длительности кровотечения обследованных животных послужило основанием для изучения динамики изменения морфометрических показателей тромбоцитов у беременных крыс при созданных моделях гипер- и гипокоагуляции. Для изучения влияния беременности на состояние тромбоцитарного звена гемостаза оценивали изменения архитектоники и ультраструктуры Тр в зависимости от состояния тромбоцитарного гемостаза и периода родов. Для этого исследовали морфометрические характеристики Тр методом КЦТр. Полученные результаты компьютерной цитоморфометрии Тр в крови крыс по сравнению с данными здоровых беременных крыс представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Морфометрические показатели Тр в группе самок крыс, с усиленным тромбообразованием ($X \pm m$, $p \leq 0,01$)

Показатели	До родов		Роды		5-е сутки после родов	
	Здоровая беременная крыса	Получающая метионин	Здоровая беременная крыса	Получающая метионин	Здоровая беременная крыса	Получающая метионин
Средний диаметр Тр, мкм	2,50±0,12	3,79±0,2*	1,85±0,09	2,2±0,1**	1,74±0,09	1,93±0,1
Площадь Тр, мкм	4,9±0,24	5,9±0,2*	3,0±0,15	3,8±0,2**	2,4±0,1	2,9±0,1***
Фактор формы	13,60±0,67	17,6±0,9*	14±0,7	14,1±0,7	18,7±0,8	11,7±0,6***
УОП кр.	0,621±0,03	0,71±0,03*	0,368±0,02	0,388±0,4	0,357±0,02	0,377±0,01***
УОП син.	0,249±0,01	0,299±0,09	0,289±0,01	0,28±0,01**	0,253±0,01	0,276±0,01**
ИОТр	0,4±0,02	0,42±0,02*	0,78±0,04	0,72±0,01	0,7±0,02	0,73±0,03***

Достоверность различия ($p \leq 0,01$) в группах:

* – до родов;

** – в день родов;

*** – на 5-е сутки после родов.

Как видно из таблицы 1, отмечается достоверное увеличение клетки в размере, увеличение фактора формы, т.е. отмечается усиление изрезанности краев Тр за счет образования псевдоподий. Повышение значений таких показателей, как средний диаметр, площадь и фактор формы тромбоцитов, свидетельствует об активации тромбоцитарного звена гемостаза. Также достоверно увеличивается насыщение Тр гранулами, что проявляется в увеличении УОП кр., и следовательно достоверно увеличивается ИОТр, что свидетельствует об увеличении «молодых» форм Тр и их функциональной активности.

Аналогичные параметры оценивались в группе самок крыс, получавших кардиомагнил с целью создания модели гипокоагуляции (при кровоточивости). Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфометрические показатели Тр в группе самок крыс при кровоточивости (X±m, p≤0,01)

Показатели	До родов		Роды			5-е сутки после родов		
	Здоровая беременная крыса	Получающая кардиомаг- нил	Здоровая беременная крыса	Получающая кардиомаг- нил	Здоровая беременная крыса	Получающая кардиомаг- нил		
Средний диаметр, мкм	2,50±0,123	2,15±0,1*	1,85±0,09	1,96±0,1	1,74±0,09	1,83±0,09		
Площадь Тр, мкм	4,9±0,24	3,7±0,2*	3,0±0,14	3,0±0,15	2,4±0,1	2,6±0,1		
Фактор формы	13,6±0,67	13,4±0,7	14,0±0,71	13,1±0,7	18,7±0,9	11,9±0,6***		
УОП кр.	0,621±0,03	0,429±0,01	0,368±0,02	0,224±0,006**	0,357±0,02	0,255±0,03***		
УОП син.	0,249±0,01	0,132±0,006*	0,159±0,01	0,056±0,003**	0,153±0,008	0,053±0,003***		
ИОТр	0,4±0,02	0,3±0,02*	0,43±0,04	0,25±0,02**	0,43±0,02	0,2±0,01***		

Достоверность различия (p≤0,01) в группах:

* – до родов;

** – в день родов;

*** – на 5-е сутки после родов.

Как видно из таблицы 2, отмечается уменьшение среднего диаметра, площади Тр, фактора формы, характеризующего изрезанность краев Тр и отражающего степень реактивности Тр, его способности активироваться и распластываться на стекле. Также отмечается достоверное уменьшение насыщения Тр гранулами, что проявляется в снижении УОП кр. и уменьшении ИОТр, что свидетельствует об уменьшении доли «молодых» активных форм клеток. У беременных самок крыс, получающих кардиомагнил, отмечались клинические проявления тромбофилии, что подтверждалось снижением морфометрических показателей тромбоцитов, а при введении метионина беременным самкам отмечались явления гиперкоагуляции, что клинически проявлялось сгущением крови и склонностью к тромбозам и что подтверждалось увеличением морфометрических показателей Тр.

По данным литературы, значение ИОТр у здоровых людей среднего возраста составляет 0,73–0,79 у.е. Повышение ИОТр свидетельствует об увеличении количества «молодых», активных форм тромбоцитов в периферической крови, снижение – об увеличении старых форм Тр [Абасова Т.В., 2006].

Полученные результаты исследования тромбоцитарного гемостаза свидетельствуют об изменении количественных, морфометрических и функциональных показателей тромбоцитов у лабораторных животных с тромбо-геморрагическими нарушениями течения беременности и родов в сравнении со здоровыми самками крыс.

Заключение. Установлено, что введение животному препаратов кардиомагнила и метионина обуславливает возможность создания модели гипо- и гиперкоагуляции в эксперименте у лабораторных животных. Лабораторные исследования тромбоцитарного гемостаза экспериментальных животных показали, что при введении кардиомагнила происходит угнетение функции тромбоцитов. Это подтверждается уменьшением их морфометрических свойств, в частности уменьшением среднего диаметра тромбоцита, его площади и фактора формы. В свою очередь, при введении метионина происходит достоверное увеличение клетки в размере, ее площади, увеличение фактора формы за счет образования псевдоподий, что свидетельствует об активации тромбоцитарного звена гемостаза. Изменения наблюдались в дородовой период, наиболее выражены в первые сутки после родов, сохранялись на 5-й день после родов в группах как при гипо- так и при гиперкоагуляции. При этом отмечался «пик 1-го дня», который в группе самок крыс с патологией гемостаза выражен сильнее, чем в группе здоровых беременных крыс.

Индекс омоложения Тр указывает на долю «молодых» активных тромбоцитов в крови у крыс. В условиях гиперкоагуляции (метионин) этот показатель увеличивается, что свидетельствует об увеличении «молодых» форм Тр и их функциональной активности, т.е. о повышенной склонности к тромбозам. В свою очередь, в условиях гипокоагуляции (кардиомагнил), отмечается уменьшение ИОТр, т.е. доля активных форм Тр уменьшается, что клинически подтверждается кровоточивостью.

Следовательно, лабораторный контроль показателей тромбоцитов во время беременности и в раннем постнатальном периоде может быть использован для оценки риска возникновения тромбогеморрагических осложнений и поиска путей устранения этих осложнений.

Список литературы

1. Арутюнян А.А. Сравнительная оценка гемостаза у женщин с антифосфолипидным синдромом в зависимости от проводимой терапии / Врач. – 2007. – № 7. – С. 63–65.
2. Баркаган З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М., 1999. – 224 с.
3. Бондарева Н.И. Морфофункциональные особенности развития потомства сенсibilизированных самок крыс : автореф. дисс. – 2008. – 22 с.
4. Иванова Т.В. Клиническое значение компьютерной морфометрии тромбоцитов при хроническом мегакариоцитарном лейкозе : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002. – 27 с.

5. Козинец Г.И. Клетки крови, современные технологии их анализа / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Д.А. Шмаров и др. – М, 2002. – 534 с.
6. Коробова Ф.В. Анализ тромбоцитов периферической крови – компьютерная морфометрия / Ф.В. Коробова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 7. – С. 36–39.
7. Мацакария А.Д., Бицадзе В.О. Тромбофилии и противотромботическая терапия в акушерской практике. – М. : Триада-Х, 2003.
8. Муратова А.Ю. Диагностика тромбофилических состояний в акушерской практике. – Ставрополь, 2008. – С. 118–121.
9. Муратова А.Ю. Состояние тромбоцитарного звена гемостаза у больных с сосудистыми осложнениями сахарного диабета 2 типа при развитии анемического синдрома : автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2004. – 26 с.
10. Korobova F.V. Morphological properties of human thrombocytes / F.V. Korobova, G.I. Kozinets // A computerized morphometric cellular pathology. – 2001. – Vol. 20. – № 7. – P. 60–61.

Рецензенты:

Барычева Л.Ю., д.м.н., профессор кафедры детских инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Ставропольская государственная медицинская академия», г. Ставрополь.

Федько Н.А., д.м.н., профессор, зав. кафедры детских болезней лечебного и стоматологического факультета ГБОУ ВПО «Ставропольская государственная медицинская академия», г. Ставрополь.

Работа получена 11.11.2011