

NO-ИНДУЦИРУЕМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ IN VITRO У КРЫС

Голубева Е.К.¹, Пахрова О.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, email: o.pahrova@mail.ru

Тромбоциты участвуют во многих физиологических процессах. Активность кровяных пластинок зависит от их структурно-функциональных характеристик, оценка которых имеет большое значение для диагностики и профилактики различных заболеваний, а также для изучения механизмов регуляции функционального состояния тромбоцитов. Оно определяется действием многих факторов, в том числе гуморальных. Одним из нетрадиционных методов, позволяющих охарактеризовать структурно-функциональные свойства тромбоцитов, является исследование стабильности их мембраны в гипотонической среде. Нами исследовались особенности осмотической резистентности тромбоцитов, подвергнутых преинкубации с донатором оксида азота (нитропруссидом натрия) в конечной концентрации 100 мкмоль/л. Оценивалось изменение количества свободных клеток и агрегатов, их размеров и формы в динамике действия гипотонического раствора, эквивалентного 0,45% NaCl. Выявлено, что как в опытных препаратах, так и в контроле гипотонический раствор индуцирует уменьшение количества свободных клеток и появление агрегатов. Морфофункциональные изменения тромбоцитов под влиянием метаболитов NO проявляются ускоренным разрушением поврежденных клеток в гипотоническом растворе, а также уменьшением индекса элонгации и площади поверхности клеток в последующей динамике, что свидетельствует о снижении их активности.

Ключевые слова: тромбоциты, осмотическая резистентность, оксид азота, крысы

NO-INDUCED CHANGES IN OSMOTIC RESISTANCE OF PLATELETS IN VITRO IN RATS

Golubeva E.K.¹, Pakhrova O.A.¹

¹Ivanovo State Medical Academy Ministry of Health of Russia, Ivanovo, email: o.pahrova@mail.ru

Platelets are involved in many physiological processes. The activity of blood plates depends on their structural and functional characteristics, the evaluation of which is of great importance for the diagnosis and prevention of various diseases, as well as for studying the mechanisms of regulation of the functional state of platelets. It is determined by the action of many factors, including humoral. One of the unconventional methods to characterize the structural and functional properties of platelets is the study of the stability of their membrane in a hypotonic medium. We investigated the features of osmotic resistance of platelets, preincubated with a donor of nitric oxide (sodium nitroprusside) at a final concentration of 100 $\mu\text{mol} / \text{l}$. The change in the number of free cells and aggregates, their size and shape in the dynamics of the action of a hypotonic solution equivalent to 0.45% NaCl was estimated. It was revealed that, both in the experimental preparations and in the control, the hypotonic solution induces a decrease in the number of free cells and the appearance of aggregates. Morphofunctional changes of platelets under the influence of NO metabolites are manifested by the accelerated destruction of damaged cells in the hypotonic solution, as well as a decrease in the elongation index and the surface area of the cells in the subsequent dynamics, which indicates a decrease in their activity.

Keywords: platelets, osmotic resistance, nitric oxide, rats

Тромбоциты являются уникальными высокодифференцированными клетками, участвующими во многих физиологических процессах: регенерации, иммунном ответе, регуляции сосудистого тонуса, ангиогенезе и ремоделировании сосудов, реализации транспортных механизмов [1]. Особую роль они играют в развитии реакций свертывания крови, являясь центральным компонентом клеточного звена гемостаза, обеспечивающим остановку кровотечения за счет образования тромбоцитарного тромба и участвующим в обеспечении эффективности образования фибрина. Активность тромбоцитов во многом

обусловлена особенностями структурного состояния мембранно-цитоскелетной системы и наличием в них большого количества биологически активных веществ, которые содержатся в секреторных везикулах (гранулах) и высвобождаются в процессе активации.

Оценка изменения функциональных свойств тромбоцитов имеет большое значение не только для диагностики многих патологических состояний (атеросклероза, ишемической болезни сердца и других), но и для их профилактики. В связи с этим изучение регуляторных механизмов, обеспечивающих активацию тромбоцитов, является весьма актуальным как для теории тромбообразования, так и для практической медицины. С целью определения морфологической и физиологической полноценности кровяных пластинок чаще всего исследуют адгезионную и агрегационную способность тромбоцитов. Эти показатели считаются информативными и адекватными критериями, косвенно характеризующими сохранность гемостатической функции тромбоцитов и их способность циркулировать в крови [2]. Одним из нетрадиционных методов исследования структурно-функционального состояния тромбоцитов, не получившим до настоящего времени широкого распространения, является оценка резистентности их мембраны в гипотоническом растворе [3].

Активность тромбоцитов может изменяться под действием многих факторов физической и химической природы [4]. Одним из гуморальных модуляторов морфофункциональных свойств этих клеток является оксид азота (NO), влияние которого на стадии сосудисто-тромбоцитарного гемостаза *in vitro* определяется количеством вещества в культуральной среде [5]. Нами показано, что инкубация с экзогенным донатором NO – нитропруссидом натрия – в конечной концентрации 100 мкмоль/л сопровождается снижением агрегационной способности тромбоцитов, свидетельствуя об угнетении их активности [6]. Тем не менее данные о влиянии оксида азота на тромбоциты не только противоречивы, но и во многом носят описательный характер, что делает актуальным выявление структурно-функциональных изменений клеток, обуславливающих модификацию их активности.

Цель исследования – выявить особенности осмотической стойкости тромбоцитов, подвергнутых преинкубации с нитропруссидом натрия.

Материал и методы исследования

В экспериментах *in vitro* использовано 16 беспородных крыс-самцов весом 200–220 г в соответствии с этическими правилами работы с животными («Правила лабораторной практики в Российской Федерации» приказ МЗ и СР РФ № 708н от 23.08.2010 г. и «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123»). Забор крови осуществлялся из левого желудочка сердца после вскрытия грудной клетки. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами, цитратную

кровь (соотношение по объему 9:1) центрифугировали 10 минут при 460 g. Плазму разделяли на 2 аликвоты (по 0,5 мл), в одну в качестве донатора NO добавляли 0,1 мл раствора нитропрусида натрия (НПН) в конечной концентрации в инкубационной среде 100 мкмоль/л, в другую – физиологический раствор в таком же количестве. В течение 15 минут пробирки инкубировали при температуре 37 °С.

«Гипотонический шок» моделировали разведением суспензии тромбоцитов дистиллированной водой в соотношении 1:1 при конечной концентрации раствора, эквивалентной по осмотическому давлению 0,45%-ному раствору хлорида натрия. Определяли исходную осмотическую резистентность тромбоцитов, а также через 5, 10 и 20 минут от начала воздействия. Фотографии препаратов «раздавленная капля», полученных с помощью оптической микроскопии, исследовали с использованием ImageJ – программы для анализа и обработки изображений. Осмотическую стойкость оценивали по изменению количества свободных клеток и агрегатов, их размеров и формы. Измеряли большой и малый диаметр клеток, площадь, индекс удлинения тромбоцита (ИУТ). $ИУТ = (L-W) / (L+W)$, где L – длина, W – ширина тромбоцита. Для более детальной характеристики изменения морфометрических параметров клеток использовали гистограммы распределения их по площади.

Для статистической обработки использовались электронные таблицы Excel и программа Statistica. Оценка достоверности различий производилась по t-критерию Стьюдента, непараметрическим критериям Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни. Нормальность распределения определялась с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении исследования выявлено, что под влиянием гипотонического раствора уже через 5 минут количество свободных тромбоцитов уменьшается как в опытных (в 6,5 раз), так и в контрольных (в 9,8 раза) препаратах ($p \leq 0,005$) (табл.). При этом число агрегатов в динамике воздействия значительно возрастает в обоих пробах, но в опыте это происходит быстрее, и к 5-й минуте показатель более чем в 3 раза превышает контрольное значение ($p \leq 0,05$).

Динамика изменения результатов морфометрического анализа препаратов суспензии тромбоцитов под влиянием гипотонического раствора ($M \pm m$)

Параметры		Исходные значения	5 минут	10 минут	20 минут
Количество свободных клеток в препарате	Контроль	305,6±78,1	60,67±21,75 *	21,60±2,80 *	25,75±2,95 *
	НПН	285,4±25,6	75,25±21,28 *	33,40±8,35 *	27,40±9,71 *
Количество	Контроль	0	8,50±1,54	21,00±6,11	26,67±2,33

агрегатов в препарате			*	*	*
	НПН	0	27,40±8,03 * #	27,00±4,14 *	28,25±4,49 *
Индекс удлинения тромбоцитов, отн. ед.	Контроль	0,204±0,051	0,179±0,033	0,170±0,023	0,151±0,017
	НПН	0,382±0,020 #	0,133±0,008 *	0,159±0,013 *	0,140±0,015 *

Примечание: * – достоверные отличия по сравнению с исходными значениями ($p \leq 0,05$),

– достоверные различия между опытной и контрольной группами ($p \leq 0,05$).

В гипотонической среде изменяется осмотический баланс клеток, что может быть причиной гибели их как *in vitro*, так и *in vivo*. В ответ на уменьшение осмотического давления активируются аквапорины, осуществляющие трансмембранный перенос молекул H_2O . В результате структурной перестройки увеличивается проницаемость мембраны тромбоцитов для ионов K^+ , Cl^- и Ca^{2+} . Вход кальция в клетку активирует кальцийзависимые процессы, изменяется структура сократительных белков цитоплазматического матрикса, происходят набухание тромбоцитов с последующим разрушением, образование псевдоподий и агрегация клеток [7]. Формируются многочисленные мелкие агрегаты, которые не разрушаются при восстановлении осмотического равновесия. В составе агрегатов диаметром до 100 мкм выявляется 90–95% клеток с гранулами [8].

Анализируя динамику ИУТ, следует отметить, что исходные значения его у тромбоцитов, предварительно инкубированных с донатором NO, на 87,5% выше, чем в контроле ($p \leq 0,05$). Однако уже через 5 минут воздействия гипотонической среды он снижается на 65% и остается на протяжении всего периода наблюдения существенно меньше исходных значений ($p \leq 0,001$). Это может быть обусловлено структурными преобразованиями и снижением стабильности мембраны тромбоцитов под влиянием метаболитов NO. В контрольных пробах аналогичных изменений не происходит. В норме в гипотоническом растворе NaCl большинство тромбоцитов имеют саблевидную форму. Секреторные гранулы цитоплазмы набухают, увеличиваются в размерах, сливаясь с мембраной [9]. Увеличение диаметра везикул является сигналом к началу выброса их содержимого в окружающую среду, инициируя активацию тромбоцитов. В последующем тромбоциты истончаются и несколько удлиняются. Причем при тромбоцитопатии количество удлиненных клеток в условиях пониженного осмотического давления среды значительно меньше.

Площадь тромбоцитов, подвергнутых инкубации с НПН, в гипотоническом растворе существенно снижается уже к 5-й минуте (рис. 1), вероятно, за счет элиминации кровяных пластинок, в большей степени подвергнутых действию повреждающих факторов, которые образуются в результате индукции NO-опосредованного свободнорадикального окисления, сопровождающегося структурно-функциональными изменениями и преждевременным

старением клеток. Это подтверждается результатами наших предыдущих исследований, позволивших выявить снижение индекса омоложения тромбоцитов в результате инкубации с раствором НПН в концентрации 100 мкмоль/л.

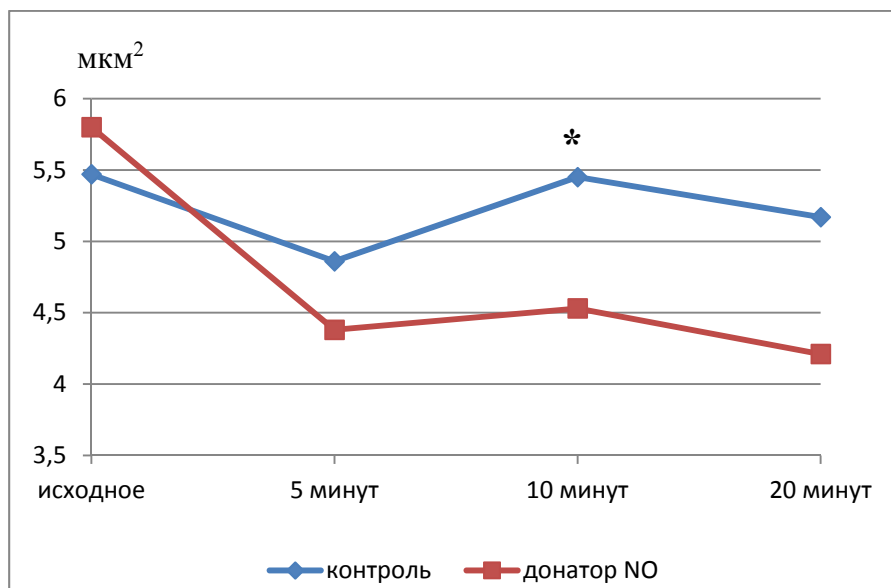


Рис. 1. Изменение площади свободных тромбоцитов в динамике действия гипотонического раствора

Примечание: * – достоверные различия между опытной и контрольной группами ($p \leq 0,05$).

Через 10 минут воздействия площадь тромбоцитов в экспериментальных препаратах была достоверно меньше контрольного значения ($p \leq 0,005$), которое практически не изменяется на протяжении всего исследуемого периода. В присутствии оксида азота наблюдается торможение эффекта накопления внутриклеточного кальция вследствие изменения конформации белков плазматической мембраны и, следовательно, ее кальциевой проницаемости [10]. Снижение активности фосфолипазы С приводит к нарушению мобилизации внутриклеточного кальция из депо. Уменьшение концентрации ионов Ca^{2+} в клетках является основной причиной подавления их активности и сопровождается угнетением транспорта воды через мембрану.

Сравнительная оценка гистограмм распределения тромбоцитов по площади свидетельствует об изменении количества тромбоцитов различного размера под действием гипотонического раствора (рис. 2). Исходные кривые характеризуются широким распределением тромбоцитов по площади с максимумом 5 мкм² и смещением гистограммы вправо в опытных образцах в результате небольшого увеличения доли более крупных клеток после инкубации с НПН.

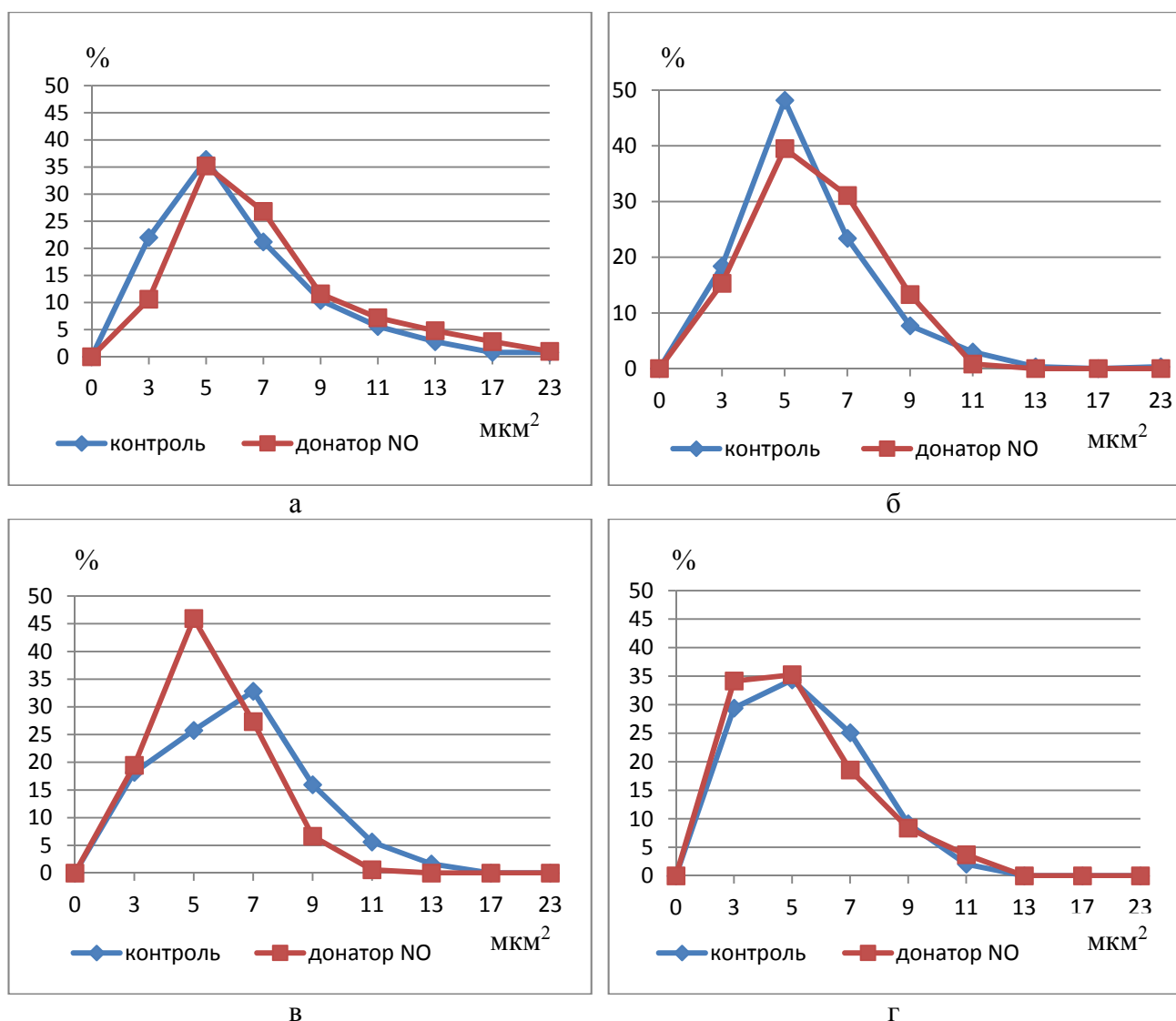


Рис. 2. Гистограммы распределения тромбоцитов по площади в динамике действия гипотонического раствора: а – исходные значения, б – 5 минут экспозиции, в – 10 минут экспозиции, г – 20 минут экспозиции

Через 5 минут нахождения тромбоцитов в гипотонической среде существенно повышается амплитуда модального класса в контроле до 50%, ширина распределения уменьшается в обеих группах, что говорит о снижении гетерогенности фракции тромбоцитов за счет исчезновения крупных клеток. Спустя 10 минут после начала инкубации в 0,45%-ном растворе хлорида натрия в опытных препаратах возрастает амплитуда максимума за счет уменьшения численности большеразмерных тромбоцитов. В контроле максимум смещается на 7 мкм², снижается амплитуда модального класса, а правая ветвь гистограммы растягивается, свидетельствуя об увеличении гетерогенности тромбоцитов за счет увеличения количества клеток большого размера. К 20-й минуте воздействия гипотонической среды в обоих образцах кривые смещаются влево с появлением двух пиков 3 и 5 мкм², что связано с увеличением фракции мелких клеток.

В норме тромбоциты циркулирующей крови имеют форму диска или пластины, состоящей из мембраны, цитоскелета, гранул и тубул [11]. В основном кровяные пластинки представлены клетками диаметром 2,8–3,4 мкм, толщиной 0,8–1,2 мкм и объемом 5,7–8,9 мкм³, с преобладанием зрелых форм, имеющих диаметр 2–3 мкм. Определяется небольшое количество молодых клеток (более 3 мкм в диаметре) и старых (менее 2 мкм). Уменьшение морфометрических свойств тромбоцитов, их площади, среднего диаметра, фактора формы является признаком угнетения функциональной активности, снижения доли «молодых» клеток. Как правило, это сопровождается отсутствием или уменьшением количества тромбоцитов с гранулами, что указывает на завершение процесса активации, а также на утрату или снижение функционального потенциала клеток [12].

Таким образом, гипотонический раствор, эквивалентный по осмотическому давлению 0,45%-ному раствору хлорида натрия, как в контрольных, так и в опытных препаратах вызывает уменьшение количества одиночных тромбоцитов и появление тромбоцитарных агрегатов. В присутствии экзогенного донатора NO, нитропрусида натрия, происходят структурно-функциональные изменения тромбоцитов и, как следствие, снижение их осмотической стойкости, проявляющееся ускоренной элиминацией в гипотонической среде поврежденных метаболитами NO клеток и подавлением трансмембранного переноса воды в динамике гипотонического воздействия. Это сопровождается уменьшением индекса элонгации и площади кровяных пластинок, что может свидетельствовать о снижении их активности.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО «ИвГМА» Минздрава России на 2019 год «Исследование функционального резерва тромбоцитарного и гуморального компонентов гемостаза при гипоксии тканей, органов и систем».

Список литературы

1. Michelson A. D. Platelets. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press, 2013. 1351 p.
2. Ветошкин К.А., Утемов С.В., Князев М.Г., Шерстнев Ф.С., Костяев А.А. Результаты криоконсервирования донорских тромбоцитных концентратов при низких и ультранизких температурах // Трансфузиология. 2015. Т. 16. № 2. С. 22-28.
3. Муравлева Л.Е., Молотов-Лучанский В.Б., Ключев Д.А., Танкибаева Н.У., Кулмагамбетов И.Р., Омаров Т.С., Ешетова С.С., Мурсалова Ж.Ш. Состояние тромбоцитарного компонента системы гемостаза у больных хроническими поражениями почек и артериальной гипертензией // Фундаментальные исследования. 2011. № 1. С. 134-139.
4. Щапова Н.Н., Омеляненко М.Г., Шумакова В.А., Томилова И.К. Психоэмоциональные факторы и эндотелиальная дисфункция как предикторы отдаленных событий у пациентов с

ишемической болезнью сердца и артериальной гипертензией // Вестник Ивановской медицинской академии. 2012. Т. 17. № 2. С. 25-29.

5. Marjanovic J.A., Li Z., Stojanovic A., Du X. Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *Biol. Chem.* 2005. vol. 280. P. 37430-37438. DOI: 10.1074/jbc.M506518200.

6. Алексахина Е.Л., Голубева Е.К., Пахрова О.А., Томилова И.К. Влияние оксида азота на морфофункциональные характеристики тромбоцитов *in vitro* у крыс // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28203> (дата обращения: 22.05.2019).

7. Марковчин А.А. Физиологические особенности тромбоцитов // Современные проблемы науки и образования. 2014. №6. [Электронный ресурс]. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=16888> (дата обращения: 21.06.2019).

8. Макаров М.С. Неканонические способы активации тромбоцитов человека // Медицинский алфавит. 2015. Т.3. № 11. С. 30-35.

9. Kim S.Y., Kim S., Yun-Choi H.S., Jho E.H. Wnt5a potentiates U46619-induced platelet aggregation via the PI3K/Akt pathway. *Mol. Cells.* 2011. vol. 32. no 4. P. 333-336. DOI: 10.1007/s10059-011-0134-3.

10. Dangel O., Mergia E., Karlisch K., Groneberg D., Koesling D., Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2010. vol. 8. no 6. P. 1343-1352. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.03806.x.

11. Пантелеев М.А., Свешникова А.Н. Тромбоциты и гемостаз // Онкогематология. 2014. Т. 9. № 2. С. 65-73.

12. Макаров М.С. Физиологическое и прогностическое значение тромбоцитов без гранул // Медицинский алфавит. 2018. Т. 3. № 26 (363). С. 32-36.