

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРОМБОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ЛАКТАТ-АЦИДОЗА IN VITRO

Голубева Е.К.¹, Пахрова О.А.¹, Алексахина Е.Л.¹, Томилова И.К.¹, Соколова М.А.¹, Пиголкина Е.И.²

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново;

²ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет» Минобрнауки России, Иваново, e-mail: elkgol@yandex.ru

Молочная кислота, представляющая собой один из продуктов анаэробного гликолиза, влияет на состояние различных физиологических систем организма. Ацидоз, развивающийся при накоплении лактата, проявляется неспецифическим морфологическим синдромом в органах и тканях, нарушает реологические и гемостатические функции крови, изменяет агрегационную активность тромбоцитов. Нами исследовались морфофункциональные особенности тромбоцитов человека в условиях лактат-ацидоза in vitro при pH 7,2 и 7,0. Определялись морфометрические параметры клеток с расчетом их площади, индекса элонгации, а также индекс омоложения тромбоцитов. О функциональной активности кровяных пластинок судили по показателям АДФ-индуцированной агрегации (степени агрегации, времени агрегации, скорости агрегации). Выявлены нарастающие по мере снижения pH увеличение площади клеток, уменьшение индекса элонгации, снижение индекса омоложения и количества тромбоцитов с грануломером. Это наряду с уменьшением агрегационной способности свидетельствует о нарушении структурно-функциональных свойств тромбоцитов при лактат-ацидозе. Анализ гендерных отличий показал наличие особенностей тромбоцитов у женщин, обеспечивающих высокую агрегационную активность в норме и резистентность к повреждающему действию лактата, что проявляется менее выраженной динамикой морфофункциональных нарушений кровяных пластинок, чем у мужчин.

Ключевые слова: гемостаз, тромбоциты, лактат-ацидоз, гендерные особенности.

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF THROMBOCYTES IN CONDITIONS OF LACTIC ACIDOSIS IN VITRO

Golubeva E.K.¹, Pakhrova O.A.¹, Aleksakhina E.L.¹, Tomilova I.K.¹, Sokolova M.A.¹, Pigolkina E.I.²

¹Ivanovo State Medical Academy of the Ministry of Health of Russia, Ivanovo;

²Ivanovo State University of the Ministry of Education and Science of Russia, Ivanovo, e-mail: elkgol@yandex.ru

Lactic acid, which is one of the products of anaerobic glycolysis, affects the state of various physiological systems of the body. Acidosis, which develops with the accumulation of lactate, is manifested by a nonspecific morphological syndrome in organs and tissues, disrupts the rheological and hemostatic functions of the blood, and changes the aggregation activity of platelets. We studied the morphological and functional features of human platelets in lactic acidosis in vitro at pH 7.2 and 7.0. The morphometric parameters of the cells were determined with the calculation of their area, elongation index, as well as platelet rejuvenation index. The functional activity of blood platelets was judged by indicators of ADP-induced aggregation (degree of aggregation, time of aggregation, rate of aggregation). An increase in cell area was observed to increase with decreasing pH. The elongation index, rejuvenation index and platelet count with a granulomer are decreased. This, along with a decreasing of aggregation ability, indicates a violation of the structural and functional properties of platelets in lactic acidosis. Analysis of gender differences showed the presence of platelet features in women, providing high aggregation activity in the norm and resistance to the damaging effect of lactate, which is manifested by a less pronounced dynamics of morphofunctional disorders of the blood platelets than in men.

Keywords: hemostasis, platelets, lactic acidosis, gender characteristics.

Молочная кислота, являющаяся одним из естественных анаэробных метаболитов, количество которых значительно возрастает при гипоксии, оказывает существенное влияние на состояние различных физиологических систем. Важную роль играет лактат-ацидоз в развитии адаптивных изменений в организме при физических нагрузках, являясь следствием увеличения потребности тканей в кислороде. В условиях ацидоза, развивающегося в

результате накопления продуктов анаэробного гликолиза, происходят значительные функциональные и морфологические изменения в тканях и органах. Показано, что при лактат-ацидозе наблюдается неспецифический морфологический синдром, проявляющийся изменением структуры, а также отеком клеток и межклеточного вещества тканей сердца, почек, печени, желудочно-кишечного тракта и др. [1].

Лактат оказывает негативное влияние на реологию крови и ее гемостатические функции, способствуя прогрессированию тканевой гипоксии и нарушению процесса образования энергии, что усугубляет патогенетические механизмы развития многих заболеваний [2]. Ацидоз сопровождается повреждением эндотелия, приводящим к инициации процессов коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, увеличивая вероятность спонтанной агрегации тромбоцитов [3]. Спонтанное тромбообразование наблюдается при различных заболеваниях, проявляющихся интоксикацией, нарушением иммунитета, сепсисом, артериальной гипертензией, является одним из наиболее значимых звеньев в развитии ишемических нарушений миокарда и мозгового кровообращения.

Литературные данные об особенностях клеточного звена гемостаза в условиях лактат-опосредованного ацидоза противоречивы и не дают четкого представления о механизмах участия тромбоцитов в реакции свертывающей системы крови на смещение pH. Уменьшение pH крови сопровождается снижением заряда поверхности тромбоцитов, создавая условия для их взаимодействия, что наряду с изменением потенциала сосудистой стенки является предпосылкой активации процессов адгезии и агрегации тромбоцитов [4]. Однако сдвиг pH в кислую сторону нарушает АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов на фоне увеличения активности коагуляционного гемостаза в связи с вероятным высвобождением тромбоцитарных факторов свертывания крови при повреждении мембраны клеток.

Агрегационная активность тромбоцитов характеризуется их морфологическими изменениями, в том числе величиной индекса омоложения, отражающего насыщенность кровяных пластинок гранулами [5]. Поэтому исследование структурных параметров кровяных пластинок наряду с оценкой функциональных свойств позволяет конкретизировать данные о характере влияния различных факторов на гемостаз и механизмах изменения активности тромбоцитов.

Цель исследования – изучение морфофункциональных особенностей тромбоцитов при лактат-ацидозе *in vitro*.

Материал и методы исследования

В экспериментах *in vitro* исследовалось влияние снижения pH плазмы крови человека до 7,2 и 7,0 на морфофункциональные параметры тромбоцитов. Для проведения исследования использовалась кровь 21 практически здорового добровольца (средний возраст – $57,9 \pm 1,9$ года), в том числе 13 мужчин ($58,8 \pm 2,3$ года) и 8 женщин ($55,9 \pm 2,3$ года). Работа проводилась

на основании разрешения независимого этического комитета, при наличии персонального информированного согласия испытуемых.

Кровь забиралась утром, натощак, из кубитальной вены и стабилизировалась 3,8%-ным раствором цитрата натрия (соотношение цитрата и крови – 1:9). Для получения плазмы, богатой тромбоцитами, цитратную кровь центрифугировали в течение 5 минут при 1500 об/мин. После удаления надосадочной жидкости кровь центрифугировали еще 10 минут при 3000 об/мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. По 1 мл плазмы, обогащенной тромбоцитами, помещали в пробирки с раствором молочной кислоты на физиологическом растворе (рН 7,2 и 7,0). В качестве контроля использовался 0,9%-ный раствор хлорида натрия (рН 7,4). После 15 минут инкубации в термостате при 37°C изготавливали мазок тромбоцитарной плазмы, который окрашивали азур-2-эозином по Романовскому.

Морфологическое исследование производилось посредством компьютерной цитоморфометрии микрофотографий мазков тромбоцитарной плазмы, полученных с применением иммерсионного объектива. Использовалась программа анализа и обработки изображений GNU Image Manipulation Program (GIMP 2.10.14), позволяющая оценивать как морфометрические, так и качественные параметры объектов исследования. Определялись такие показатели, как большой и малый диаметр клетки, индекс элонгации тромбоцита, площадь клетки [6]. На основании особенностей окраски препарата рассчитывался индекс омоложения тромбоцитов (ИОТр), отражающий соотношение количества «молодых» и «старых» кровяных пластинок. При использовании в качестве красителя азур-эозина гранулы тромбоцитов приобретают фиолетово-красную окраску. Цветояркие характеристики препарата (доля красного и синего цвета) отражают возраст тромбоцитов. При увеличении количества «молодых», активных форм тромбоцитов происходит увеличение интенсивности синего цвета по отношению к остальным цветам. Увеличение доли красного цвета указывает на появление большого количества «старых» клеток. В зависимости от степени насыщенности гранулами (функциональной активности) изменяется удельная оптическая плотность тромбоцитов, определяемая по зеленой компоненте.

Контроль функциональной активности тромбоцитов производился посредством исследования их АДФ-индуцированной агрегации методом оптической агрегометрии (турбидиметрический метод) с использованием агрегометра AP 2110 (Solar, Беларусь) в динамике изменения светопропускающей способности обогащенной тромбоцитами плазмы против плазмы, бедной тромбоцитами. Определялись: степень агрегации (СтА, %), время максимальной агрегации (ВрА, с), скорость агрегации (СкА, %/мин).

Вариационный анализ полученных результатов проводился в электронных таблицах Excel и программе Statistica 6.0. Определялись среднее арифметическое (M), среднее квадратическое отклонение (σ), ошибка среднего (m). Для оценки статистической значимости

различий использовались t-критерий Стьюдента, непараметрические критерии Колмогорова–Смирнова и Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Проверка нормальности распределения производилась с помощью критерия Шапиро–Уилка.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные результаты позволили выявить увеличение площади тромбоцитов в кислой среде, нарастающее по мере снижения рН (рис. 1). При рН 7,2 увеличивается преимущественно малый диаметр, составляя $3,1 \pm 0,04$ мкм, при $2,86 \pm 0,06$ мкм в контроле ($p=0,0043$). Снижение рН до 7,0 сопровождается статистически значимым увеличением и малого, и большого диаметров кровяных пластинок. Так, ширина тромбоцитов (малый диаметр) увеличивается до $3,24 \pm 0,06$ мкм ($p=0,0020$), а длина (большой диаметр) – до $4,38 \pm 0,09$ мкм при $4,05 \pm 0,07$ мкм в контроле ($p=0,0356$). В среде с рН 7,2 наблюдается уменьшение индекса элонгации (рис. 2).

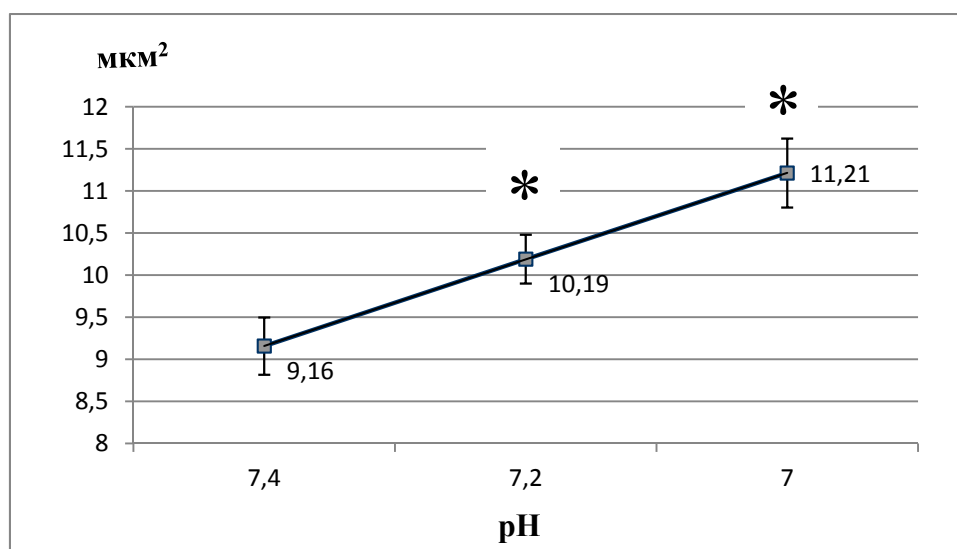


Рис. 1. Изменение площади тромбоцитов при уменьшении рН среды

Примечание: здесь и далее * – статистически значимые различия между опытной и контрольной (рН – 7,4) группами ($p \leq 0,05$).

Возможно, в условиях увеличения концентрации цитозольного кальция, усугубляющегося при ацидозе, происходят активация киназ и ингибирование фосфатаз, способствующие изменению структуры белков цитоскелета и набуханию тромбоцитов [7, 8]. По мере уменьшения рН происходит снижение количества клеток с грануломером (рис. 3). Это сопровождается уменьшением индекса омоложения тромбоцитов, который в среде с рН 7,0 составляет $1,04 \pm 0,01$ при $1,11 \pm 0,02$ в контроле ($p=0,0012$). В то же время отмечается увеличение оптической плотности тромбоцитов, оцениваемое по зеленой компоненте цветояростной характеристики препарата. Вероятно, на фоне уменьшения общего количества «молодых» тромбоцитов происходит увеличение степени насыщения их

гранулами, характеризуя нарушение процесса экзоцитоза в условиях снижения рН при лактат-ацидозе.

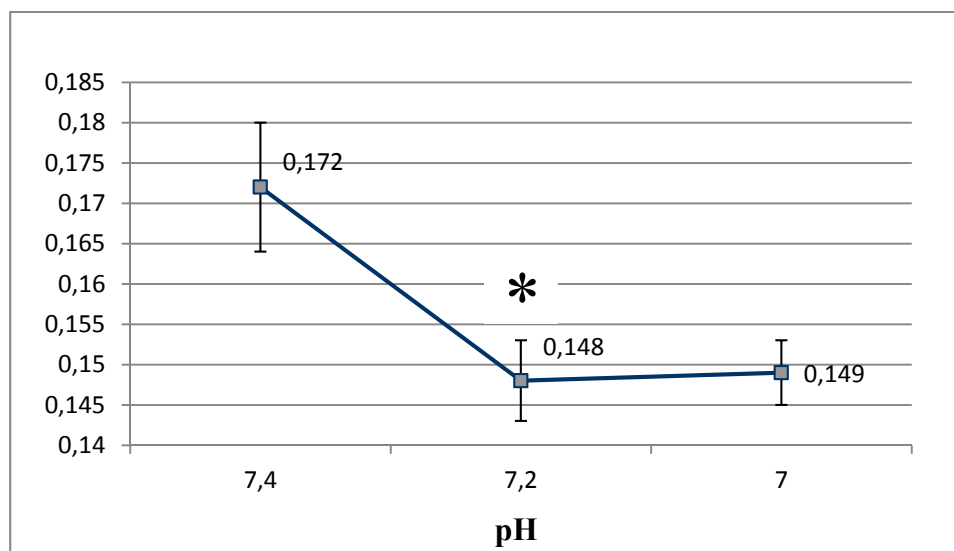


Рис. 2. Изменение индекса элонгации тромбоцитов при уменьшении рН среды

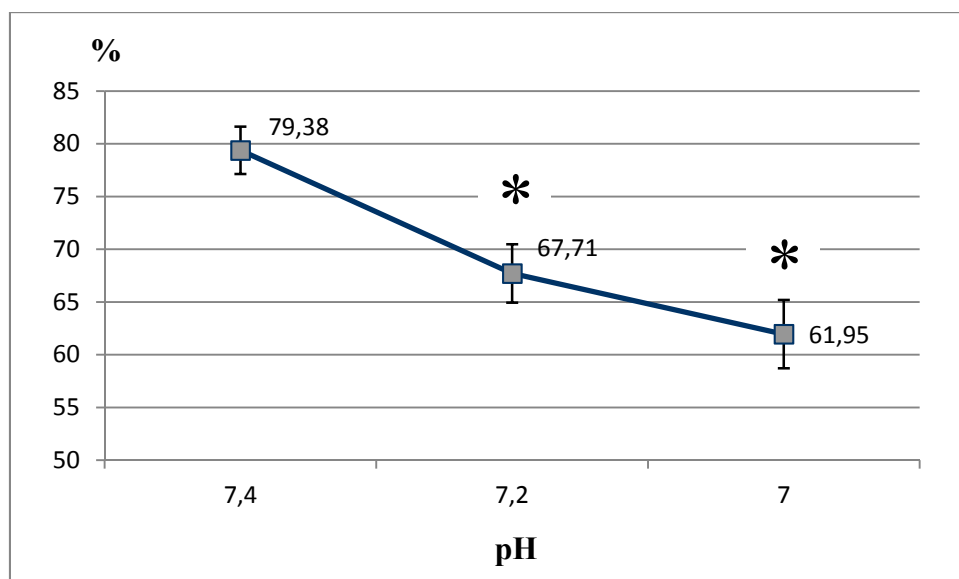


Рис. 3. Изменение процентного содержания тромбоцитов с грануломером в препарате при уменьшении рН среды

Исследование влияния молочной кислоты на агрегационную способность тромбоцитов выявило изменение параметров АДФ-индуцированной агрегации, свидетельствующее об уменьшении функциональной активности кровяных пластинок. Уменьшение рН до 7,2 сопровождается снижением степени агрегации и скорости агрегации за первые 30 секунд. Так, СтА составляет $32,49 \pm 2,94\%$, а СкА – $18,97 \pm 1,01\%/мин$ при $47,57 \pm 2,51\%$ и $26,30 \pm 1,52\%/мин$ в контроле соответственно ($p=0,0005$, $p=0,0003$). Время максимальной агрегации сокращается практически в 2 раза, составляя $173,0 \pm 22,95$ с при $301,75 \pm 38,67$ с в контрольной пробе с рН

7,4 ($p=0,009$). Дальнейшее уменьшение рН (7,0) приводит к более выраженному угнетению агрегационных свойств тромбоцитов, что проявляется уменьшением угла наклона и амплитуды кривой агрегации. Степень максимальной агрегации при этом становится равной $6,81\pm 1,08\%$ ($p<0,0001$), время агрегации – $75,43\pm 6,40$ с ($p<0,0001$), а скорость агрегации – $7,03\pm 1,03\%/мин$ ($p<0,0001$).

Следует отметить, что концентрация свободных тромбоцитов в суспензии с рН 7,0 составляет $279,64\pm 7,37$ г/л, а при рН 7,2 – $299,84\pm 6,7$ г/л ($p=0,0492$). Возможно, это является следствием повреждающего действия водородных ионов на поверхностную мембрану кровяных пластинок с последующим их разрушением. Однако уменьшение количества свободных тромбоцитов может быть обусловлено спонтанной агрегацией. Известно, что смещение рН в кислую сторону нарушает процесс диссоциации карбоксильных групп сиаловых кислот мембраны. Это приводит к снижению заряда кровяных пластинок, является предпосылкой нарушения их взаимного отталкивания и обуславливает экспрессию рецепторов, участвующих во взаимодействии тромбоцитов, вызывая их спонтанную агрегацию [3]. Наряду с этим подавляется индуцирующее влияние АДФ на процесс обратимой агрегации.

Анализ гендерных особенностей позволил выявить различия морфологии и агрегационных свойств тромбоцитов у мужчин и женщин как в состоянии кислотно-основного баланса, так и при лактат-ацидозе. Так, площадь клеток у мужчин в среде с нормальным значением рН меньше, чем у женщин, и возрастает по мере увеличения кислотности среды одновременно с уменьшением содержания тромбоцитов с грануломером, ИОТр (табл.) и увеличением их оптической плотности. Отрицательная динамика содержания тромбоцитов, имеющих грануломер, и индекса омоложения тромбоцитов у женщин менее выражена, чем у мужчин, и проявляется только при рН 7,0. Все это может свидетельствовать о более высокой исходной активности кровяных пластинок женщин и большей устойчивости их мембраны при уменьшении рН.

Гендерные отличия морфофункциональных параметров тромбоцитов
в зависимости от рН среды ($M\pm m$)

| Параметры | | рН 7,4 | рН 7,2 | рН 7,0 |
|--|---------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Площадь тромбоцитов, $\mu\text{м}^2$ | Мужчины | $8,48\pm 0,44$ | $9,81\pm 0,37$ * ($p=0,0314$) | $11,32\pm 0,65$ * ($p=0,0017$) |
| | Женщины | $10,06\pm 0,34$ # ($p=0,0110$) | $10,70\pm 0,45$ | $11,07\pm 0,45$ |
| Содержание тромбоцитов с грануломером в препарате, % | Мужчины | $79,00\pm 2,82$ | $65,00\pm 3,83$ * ($p=0,008$) | $59,08\pm 4,01$ * ($p=0,0006$) |
| | Женщины | $79,89\pm 3,84$ | $71,33\pm 3,88$ | $65,58\pm 5,34$ * ($p=0,0493$) |
| Индекс омоложения тромбоцитов, | Мужчины | $1,10\pm 0,02$ | $1,08\pm 0,04$ | $1,02\pm 0,02$ * ($p=0,0098$) |

| | | | | |
|-----------------------------------|---------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| отн. ед. | Женщины | 1,13±0,03 | 1,09±0,03 | 1,05±0,02 * (p=0,0452) |
| Степень максимальной агрегации, % | Мужчины | 42,53±2,32 | 28,12±2,23 * (p=0,0002) | 6,42±1,39 * (p<0,0001) |
| | Женщины | 54,60±4,30 # (p=0,0310) | 39,58±6,27 | 7,45±1,82 * (p<0,0001) |
| Время максимальной агрегации, с | Мужчины | 242,54±40,94 | 128,31±8,61 * (p=0,0171) | 72,38±8,01 * (p=0,0013) |
| | Женщины | 383,00±66,94 | 245,63±50,26 | 80,38±11,10 * (p=0,0025) |
| Скорость агрегации, %/мин | Мужчины | 25,46±1,33 | 18,00±1,23 * (p=0,0004) | 6,81±1,37 * (p<0,0001) |
| | Женщины | 27,53±3,33 | 20,55±1,69 | 7,39±1,62 * (p=0,0003) |

Примечание: * – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) показателей с исходными значениями, # – статистически значимые различия показателей у мужчин и женщин при pH 7,4.

Степень АДФ-индуцированной агрегации при нормальном значении pH существенно ниже у мужчин, чем у женщин, что подтверждает меньший уровень изначальной агрегационной активности клеток. Показано, что андрогены снижают агрегацию тромбоцитов *in vitro* [9], а эстрогены, напротив, повышают их адгезивно-агрегационные свойства [10]. При pH 7,2 отмечается уменьшение функциональных параметров тромбоцитов у мужчин, что усугубляется в условиях дальнейшего снижения pH. Аналогичные изменения тромбоцитов женщин происходят лишь при уменьшении pH до 7,0, что еще раз подчеркивает повышенную стабильность мембраны и большой функциональный резерв тромбоцитов в кислой среде.

Таким образом, влияние лактат-ацидоза на клеточный компонент гемостаза выражается в прогрессирующем по мере снижения pH увеличении площади тромбоцитов с уменьшением индекса элонгации, что происходит на фоне снижения индекса омоложения и количества клеток с грануломером при увеличении степени насыщения гранулами, указывающем на нарушение процесса дегрануляции. Уменьшение параметров АДФ-индуцированной агрегации, происходящее одновременно со снижением численности свободных клеток, может быть как результатом разрушения тромбоцитов в кислой среде, так и следствием активации процесса их спонтанной агрегации в результате изменения поверхностного заряда.

Тромбоциты женщин характеризуются изначально более высокой АДФ-индуцированной агрегационной активностью по сравнению с мужчинами, а также большей площадью, не претерпевающей изменений в кислой среде, что свидетельствует о более высокой стабильности компонентов цитоплазматической мембраны женских тромбоцитов. Это подтверждается менее выраженной отрицательной динамикой показателей «возрастного» состава клеток и их агрегационной способности под влиянием молочной кислоты у женщин.

Исследование проведено как часть работы по реализации государственного задания ФГБОУ ВО «ИвГМА» Минздрава России «Исследование функционального резерва тромбоцитарного и гуморального компонентов гемостаза при гипоксии тканей, органов и систем» на 2019 год.

Список литературы

1. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
2. Ефименко О.А., Родионова И.А. Гемостаз и женские половые гормоны. Обзор литературы // Репродуктивная эндокринология. 2018. №1(39). С. 21–26. DOI: 10.18370/2309-4117.2018.39.21-26.
3. Альфонсова Е.В. Изменение некоторых показателей системы гемостаза при лактатацидозе // Фундаментальные исследования. 2013. №5. С.240–244.
4. Альфонсова Е.В., Фоменко Е.Г., Стасюк О.Н. Нарушения кислотно-основного состояния у спортсменов: монография. Чита: Забайкальский гос. ун-т, 2017. 172 с.
5. 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. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28203> (дата обращения: 13.12.2019).
6. Бондарь Т.П., Цатурян Е.О., Муратова А.Ю. Влияние состояния тромбоцитарного звена гемостаза матери на морфо-функциональные показатели тромбоцитов новорожденных // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2012. № 4. С.57–60.
7. Boulanger C.M., Dignat-George F. Microparticles: an introduction. *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 2011. V.31. P. 2-3. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.218123.
8. Марковчин А.А. Физиологические особенности тромбоцитов // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=16888> (дата обращения: 08.01.2020).
9. Керимова К.Н., Бахшалиев А.Б., Гаджиев Р.Ф., Гамидова Э.С. Мужской половой гормон тестостерон и факторы гемостаза у молодых мужчин, перенесших инфаркт миокарда // Кардиология. 2012. Т.52, №6.С.24-27.
10. Hvas A.-M., Favaloro E.J. Gender related issues in thrombosis and hemostasis. *Expert review of hematology.* 2017. V.10(11). P.941–949. DOI: 10.1080/17474086.2017.1371010.