

ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ И ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ КАК РЕЗУЛЬТАТ ПРЕИНКУБАЦИИ С ДОНАТОРОМ ОКСИДА АЗОТА IN VITRO У КРЫС

Кормилицына М.А.¹, Голубева Е.К.¹, Пахрова О.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, e-mail: socolova2@gmail.com

Тромбоциты являются одним из ключевых компонентов гемостаза, участвуя не только в процессе формирования тромбоцитарного тромба, но и в механизме образования фибрина. На активность кровяных пластинок влияет ряд гуморальных факторов, одним из которых является оксид азота (NO). Эффекты NO на тромбоциты in vitro зависят от концентрации его донатора в культуральной среде. Нами исследованы особенности действия нитропруссид натрия в концентрации 1000 мкмоль/л на морфологические характеристики и осмотическую стойкость тромбоцитов in vitro у крыс. Исследовались такие морфологические показатели, как длина, ширина, площадь тромбоцитов, индекс их омоложения, количество кровяных пластинок с грануломером. Осмотическую резистентность оценивали по изменению количества свободных тромбоцитов, их агрегатов и площади тромбоцитов в динамике действия гипотонического раствора, эквивалентного по осмотическому давлению 0,45%-ному раствору NaCl. Показано, что преинкубация с нитропруссидом натрия в конечной концентрации 1000 мкмоль/л сопровождается уменьшением размеров тромбоцитов, индекса их омоложения, количества кровяных пластинок с грануломером, снижением осмотической стойкости. Это может косвенно свидетельствовать об уменьшении функциональной активности кровяных пластинок и о структурных изменениях клеточной мембраны в результате воздействия производных оксида азота.

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

PECULIARITIES OF MORPHOLOGY AND OSMOTIC RESISTANCE OF PLATELETS AS A RESULT OF PREINCUBATION WITH AN IN VITRO NITROXIDE DONATOR IN RATS

Kormilitsyna M.A.¹, Golubeva E.K.¹, Pakhrova O.A.¹

¹Ivanovo State Medical Academy Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: socolova2@gmail.com

Platelets are one of the key components of hemostasis, participating both in the platelet thrombus formation process and in the fibrin formation mechanism. A number of humoral factors affect the activity of platelets, one of which is nitric oxide (NO). The effects of NO on platelets in vitro depend on the concentration of its donor in the culture medium. We studied the features of the action of sodium nitroprusside at a concentration of 1000 μmol/L on the morphological characteristics and osmotic resistance of platelets in vitro in rats. We studied morphological parameters such as length, width, platelet area, index of their rejuvenation, number of platelets with granules. Osmotic resistance was assessed by the number of free platelets change, their aggregates and platelet area in the hypotonic solution dynamics action, equivalent in osmotic pressure to 0.45% NaCl solution. It was shown that preincubation with a final concentration of 1000 μmol/L sodium nitroprusside is accompanied by a decrease in the size of platelets, their rejuvenation index, the number of platelets with granules, and a decrease in osmotic resistance. This may indirectly indicate a decrease in the functional activity of platelets and structural changes in the cell membrane as a result of exposure to nitric oxide derivatives.

Keywords: hemostasis, platelets, nitric oxide, osmotic resistance, rats.

Одним из ключевых компонентов гемостаза являются тромбоциты. Эти кровяные безъядерные дисковидные пластинки постоянно секретируют в кровяное русло содержимое своих гранул и, несмотря на небольшой размер, являются одним из главных участников процесса гемостаза [1]. Основными функциями тромбоцитов служат остановка кровотечения посредством образования тромбоцитарного тромба в месте повреждения сосуда, а также участие в образовании фибрина [2, 3]. Тромбоциты являются постклеточными структурами,

которые активируются при воздействии агонистов, таких как тромбин, арахидоновая кислота, аденозиндифосфат (АДФ) или коллаген [4]. Когда агонист связывается с рецептором на поверхности тромбоцитов, происходит перестройка цитоскелета, что является необходимым условием для агрегации кровяных пластинок и образования тромбов [5]. Изменение функциональных свойств тромбоцитов имеет важное значение в патогенезе ишемической болезни сердца и нарушений мозгового кровообращения, обусловленных тромботическим повреждением сосудов. В связи с этим актуальными являются исследование и систематизация механизмов регуляции тромбоцитарного звена гемостаза.

Активность тромбоцитов определяется воздействием разного рода гуморальных факторов. Эндотелиальные клетки продуцируют ингибиторы, которые контролируют количество тромбоцитов в области повреждения сосуда. Особое влияние на тромбоциты и непосредственно на процесс гемостаза оказывает оксид азота (NO). Известно, что NO ингибирует адгезию тромбоцитов к эндотелию и их последующую агрегацию, а также обладает рядом эффектов, которые приводят к вазорелаксации, эндотелиальной регенерации и ингибированию хемотаксиса лейкоцитов [6, 7]. Известно, что особенности влияния NO на функциональные свойства тромбоциты *in vitro* определяются концентрацией донатора в культуральной среде [8]. В нашей лаборатории было показано, что инкубация с нитропруссидом натрия, который является экзогенным донатором NO, в конечной концентрации 100 мкмоль/л приводит к снижению агрегационной способности тромбоцитов, что может свидетельствовать об угнетении их активности [9]. Кроме того, присутствие нитропрусида натрия в этой концентрации приводит к структурно-функциональным изменениям тромбоцитов и снижению их осмотической стойкости, что проявляется ускоренной гибелью кровяных пластинок, поврежденных метаболитами NO, в гипотонической среде [10].

Цель исследования – выявление особенностей влияния нитропрусида натрия в концентрации 1000 мкмоль/л на морфологические характеристики и осмотическую стойкость тромбоцитов *in vitro* у крыс.

Материал и методы исследования

В экспериментах *in vitro* использовано 10 беспородных крыс-самцов весом 200–220 г. Работа проводилась в соответствии с этическими правилами экспериментов с животными («Правила лабораторной практики в Российской Федерации» приказ МЗ и СР РФ № 708н от 23.08.2010 г.). После эвтаназии, осуществляемой посредством цервикальной дислокации, и торакотомии производили забор крови из левого желудочка сердца. Цитратную кровь (соотношение 9:1) центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин для получения богатой тромбоцитами плазмы (центрифуга ОПН-3, Россия). Затем из обогащенной тромбоцитами

плазмы отбирали 2 порции по 0,5 мл. К первой порции тромбоцитарной суспензии в качестве экзогенного донатора оксида азота добавляли 0,1 мл раствора нитропруссид натрия (НПН) с конечной концентрацией в инкубационной среде 1000 мкмоль/л. В качестве контроля использовали суспензию тромбоцитов, в которую добавляли такое же количество 0,9%-ного раствора NaCl. Обе пробирки подвергали инкубации в термостате (термостат ТВ-80-1, Россия) при температуре 37°C в течение 15 мин. Для морфологического анализа мазки суспензии тромбоцитов окрашивали азур-2-эозином по Романовскому и делали микрофотографии с применением иммерсионного объектива (микроскоп «Ломо Микмедво-1», Россия). Фотографии обрабатывали посредством компьютерной цитоморфометрии с использованием GNU Image Manipulation Program (GIMP 2.10.14, США). Определяли большой и малый диаметр тромбоцитов (рис. 1), их площадь и индекс элонгации. В препарате подсчитывалось количество тромбоцитов с грануломером. На основании анализа преобладания красного или синего цветов спектра в окрашенном препарате производили расчет индекса омоложения тромбоцитов (ИОТр), показывающего соотношение количества «молодых» и «старых» кровяных пластинок.

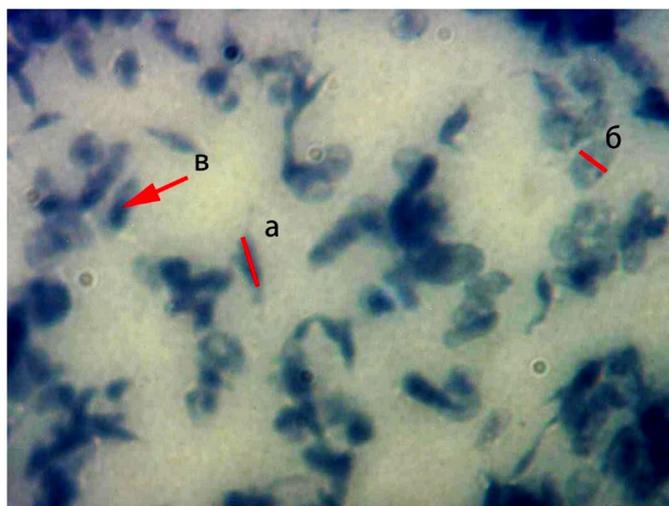
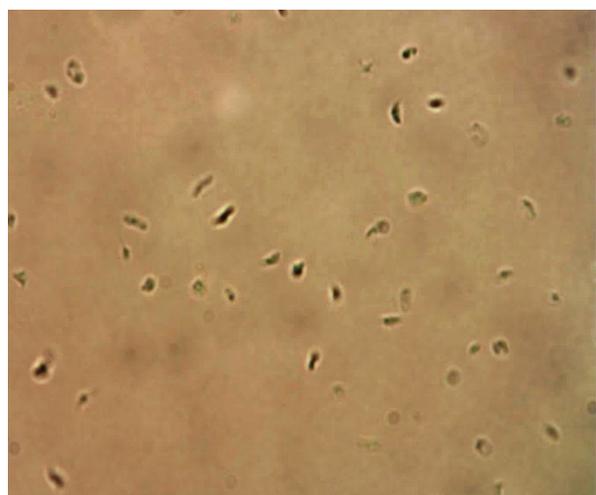


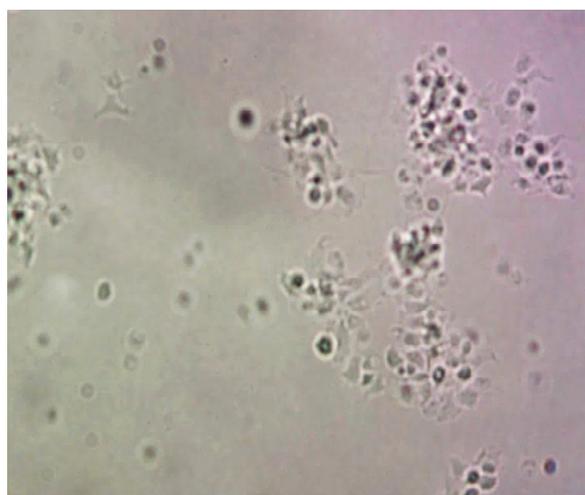
Рис. 1. Микрофотография мазка тромбоцитарной суспензии (окраска азур-2-эозином по Романовскому, увеличение – $\times 1000$); а – длина тромбоцита, б – ширина тромбоцита, в – тромбоцит с грануломером

При используемом способе окраски гранулы кровяных пластинок приобретают фиолетово-красный цвет, благодаря чему возможно оценить степень зрелости тромбоцитов в зависимости от интенсивности красного или синего цвета. Повышение доли синего по отношению к остальным цветам свидетельствует об увеличении количества «молодых» форм. Увеличение доли красного цвета характеризует преобладание в препарате «старых» тромбоцитов. О функциональной активности тромбоцитов можно судить по степени

насыщенности их гранулами, от которой зависит удельная оптическая плотность кровяных пластинок. Для исследования осмотической резистентности тромбоцитов использовали «гипотонический шок», который воспроизводили разведением тромбоцитарной суспензии дистиллированной водой в соотношении 1:1. Конечная концентрация раствора по осмотическому давлению соответствовала 0,45%-ному раствору NaCl. Готовили препараты «раздавленная капля» и фотографировали их сразу после добавления дистиллированной воды, а также через 5, 10 и 20 мин воздействия. Фотографии препаратов, полученных с помощью оптической микроскопии (микроскоп «Ломо Микмедь_{во}-1», Россия), исследовали с использованием программы GIMP 2.10.14. Осмотическую стойкость тромбоцитов оценивали по изменению количества, размеров и формы свободных кровяных пластинок (рис. 2а), а также количества и размеров их агрегатов в препарате (рис. 2б). Определяли длину, ширину, площадь и индекс элонгации тромбоцитов (ИЭТ). $ИЭТ = (L-W)/(L+W)$, где L – длина, W – ширина тромбоцита.



а



б

*Рис. 2. Суспензия тромбоцитов (неокрашенный препарат «раздавленная капля», ув. x1000):
а – единичные тромбоциты в физиологическом растворе, б – агрегаты тромбоцитов в гипотонической среде (20 мин экспозиции)*

Статистический анализ полученных результатов производили с использованием программы Statistica (StatSoft, США) и электронных таблиц Excel. Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Рассчитывали среднее арифметическое, среднее квадратическое отклонение, ошибку среднего. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологический анализ мазков тромбоцитарной суспензии показал, что ИОТр достоверно меньше в препаратах тромбоцитов, инкубированных с НПН, и составляет $1,20 \pm 0,07$ по сравнению с $1,59 \pm 0,05$ в контроле ($p=0,0017$) (рис. 3). Это указывает на снижение количества «молодых» форм, уменьшение функциональной активности тромбоцитов и, как следствие, угнетение тромбоцитарного компонента гемостаза [9]. Длина, ширина и площадь тромбоцитов, инкубированных с НПН, составляют $3,7 \pm 0,18$ мкм, $1,85 \pm 0,07$ мкм, $5,42 \pm 0,43$ мкм² соответственно, что достоверно меньше, чем в контроле ($4,61 \pm 0,13$ мкм ($p=0,0028$), $2,5 \pm 0,15$ мкм ($p=0,0053$), $9,09 \pm 0,67$ мкм² ($p=0,0015$) соответственно). Это может быть обусловлено образованием более мелких кровяных пластинок при их разрушении в результате повреждающего влияния производных оксида азота. Однако уменьшение морфометрических показателей сопровождается снижением количества тромбоцитов с грануломером в опытных препаратах до $48,0 \pm 2,58$ по сравнению с $61,14 \pm 1,75$ в контроле ($p=0,0025$), что может свидетельствовать о более низкой функциональной активности кровяных пластинок. При активации тромбоцитов увеличивается проницаемость мембраны для ионов калия, хлора и кальция [11]. Благодаря поступлению кальция в цитоплазму активируются кальцийзависимые процессы, преобразуется структура сократительных белков цитоплазматической сети и происходит увеличение размеров тромбоцитов с последующим образованием псевдоподий и необратимой агрегацией [12].

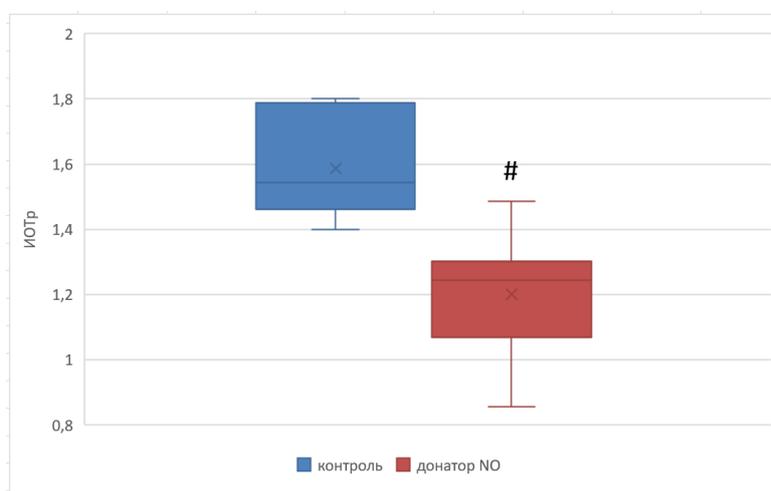


Рис. 3. Изменение ИОТр при инкубации тромбоцитов с нитропруссидом натрия в концентрации 1000 мкмоль/л

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

В гипотонической среде количество свободных кровяных пластинок уменьшается уже через 5 мин как в препаратах тромбоцитов, предварительно инкубированных с раствором

нитропрусида натрия в концентрации 1000 мкмоль/л (в 15 раз), так и в контроле (в 16 раз) (таблица). Количество агрегатов, напротив, возрастает в опытных и в контрольных препаратах.

У тромбоцитов, инкубированных с НПН, в гипотонической среде исходный индекс удлинения в 1,5 раза больше, чем в контроле ($p=0,0027$). Однако уже через 5 мин «гипотонического шока» этот показатель уменьшается с $0,31\pm 0,03$ до $0,22\pm 0,03$ ($p=0,0404$), тогда как в контроле аналогичные изменения отсутствуют, что может быть связано с нарушением стабильности мембраны тромбоцитов, подвергнутых влиянию оксида азота и его метаболитов. Известно, что в гипотонической среде изменяется осмотический баланс тромбоцитов, что становится причиной их гибели. В ответ на уменьшение осмотического давления среды активируются белки аквапорины, ответственные за трансмембранный перенос молекул воды, с последующим набуханием и повреждением кровяных пластинок [13]. В опытных препаратах этот процесс начинается быстрее и выражен в большей степени.

Результаты морфометрического исследования препаратов суспензии тромбоцитов в гипотоническом растворе ($M\pm m$)

Время воздействия (мин)	Количество свободных тромбоцитов в препарате		Количество агрегатов в препарате		Индекс элонгации тромбоцитов, отн. ед.	
	Контроль	Донатор NO	Контроль	Донатор NO	Контроль	Донатор NO
0	$310,14\pm 18,74$	$354,29\pm 21,31$	0	0	$0,19\pm 0,02$	$0,31\pm 0,03$ #
5	$34,00\pm 7,24$ *	$35,57\pm 5,89$ *	$24,86\pm 2,10$ *	$23,43\pm 4,01$ *	$0,27\pm 0,04$	$0,22\pm 0,03$ *
10	$24,57\pm 4,24$ *	$31,86\pm 8,18$ *	$20,86\pm 2,58$ *	$21,71\pm 3,92$ *	$0,18\pm 0,02$	$0,16\pm 0,02$ *
20	$20,29\pm 2,31$ *	$22,86\pm 3,66$ *	$27,14\pm 4,90$ *	$20,43\pm 3,10$ *	$0,21\pm 0,04$	$0,22\pm 0,03$ *

Примечание: * – достоверные отличия по сравнению с исходными значениями ($p\leq 0,05$), # – достоверные различия между опытной и контрольной группами ($p\leq 0,05$).

Площадь тромбоцитов, предварительно инкубированных с НПН, при помещении в гипотоническую среду более чем в 10 раз больше, чем в контрольных препаратах, и составляет $3,81\pm 0,15$ мкм² при $3,05\pm 0,16$ мкм² в контроле ($p=0,0047$), что может быть следствием ускоренного перехода воды в кровяную пластинку при увеличении проницаемости ее мембраны. Через 20 мин воздействия гипотонического раствора площадь тромбоцитов опытной группы уменьшается до $2,69\pm 0,16$ мкм², тогда как в контроле она составляет $3,22\pm 0,15$ мкм² ($p=0,0360$), несколько превышая исходное значение. Площадь тромбоцитов опытных препаратов в гипотоническом растворе уменьшается уже к 10-й минуте экспозиции (рис. 4), вероятно, благодаря разрушению кровяных пластинок, наиболее

подверженных действию метаболитов оксида азота, индуцирующих процессы свободнорадикального окисления и структурно-функциональные изменения мембраны, характеризующие преждевременное старение кровяных пластинок.

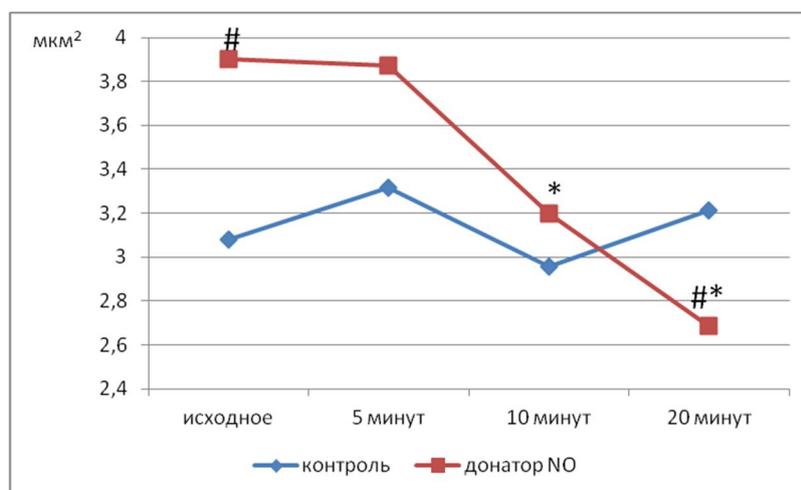


Рис. 4. Изменение площади свободных тромбоцитов в динамике действия гипотонического раствора

Выводы

Таким образом, следствием инкубации с нитропруссидом натрия в конечной концентрации 1000 мкмоль/л является уменьшение морфометрических параметров тромбоцитов, что может быть результатом их разрушения под влиянием метаболитов оксида азота. Снижение индекса омоложения и количества кровяных пластинок с грануломером свидетельствует об их более низкой функциональной активности, что, в свою очередь, может проявляться уменьшением размеров кровяных пластинок. Повреждающее действие производных оксида азота сопровождается пониженной осмотической резистентностью мембраны тромбоцитов, следствием чего является ускорение процесса их набухания и разрушения в гипотонической среде.

Работа является частью комплексного исследования, выполняемого в соответствии с планом государственного задания ФГБОУ ВО «ИвГМА» Минздрава России на 2020 год «Исследование функционального резерва тромбоцитарного и гуморального компонентов гемостаза при гипоксии тканей, органов и систем».

Список литературы

1. de Queiroz M.R., de Sousa B.B., da Cunha Pereira D.F., Mamede C.C.N., Matias M.S., de Moraes N.C.G., de Oliveira Costa J., de Oliveira F. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon*. 2017. no. 133. P. 33-47.

2. Broos, H.B. Feys, S.F. De Meyer, K. Vanhoorelbeke, H. Deckmyn. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011. vol. 4. no. 25. P. 155-167.
3. Whelihan M.F., Zachary V., Orfeo T., Mann K.G. Prothrombin activation in blood coagulation: the erythrocyte contribution to thrombin generation. *Blood*. 2012. vol. 18. no. 120. P. 3837-3845.
4. Olas B. Biochemistry of blood platelet activation and the beneficial role of plant oils in cardiovascular diseases. *Adv. Clin. Chem*. 2020. no. 95. P. 219-243.
5. Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010. vol. 12. no. 30. P. 2341-2349.
6. Radziwon-Balicka A., Lesyk G., Back V., Fong T., Loredó-Calderon E.L., Dong B., El-Sikhry H., El-Sherbeni A.A., El-Kadi A., Ogg S., Siraki A., Seubert J.M., Santos-Martinez M.J., Radomski M.W., Velazquez-Martinez C.A., Winship I.R., Jurasz P. Differential eNOS-signalling by platelet subpopulations regulates adhesion and aggregation. *Cardiovasc. Res*. 2017. vol. 14. no. 113. P. 1719-1731.
7. Schini-Kerth V.B. Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol*. 1999. vol. 6. no. 6. P. 355-63.
8. Marjanovic J.A., Li Z., Stojanovic A., Du X. Stimulatory roles of nitric-oxide synthase 3 and guanylyl cyclase in platelet activation. *J. Biol. Chem*. 2005. vol. 45. no. 280. P. 37430-37438.
9. 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.scienceeducation.ru/ru/article/view?id=28203> (дата обращения: 11.12.2020).
10. Голубева Е.К., Пахрова О.А. NO-индуцируемые изменения осмотической резистентности тромбоцитов *in vitro* у крыс // Современные проблемы науки и образования. 2019. № 3. [Электронный ресурс]. URL: [Электронный ресурс]. URL: <https://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=28959> (дата обращения: 11.12.2020).
11. Agbani E.O., van den Bosch M.T., Brown E., Williams C.M., Mattheij N.J., Cosemans J.M., Collins P.W., Heemskerk J.W., Hers I., Poole A.W. Coordinated Membrane Ballooning and Procoagulant Spreading in Human Platelets. *Circulation*. 2015. vol. 15. no. 132. P. 1414-1424.
12. Марковчин А.А. Физиологические особенности тромбоцитов // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://scienceeducation.ru/ru/article/view?id=16888> (дата обращения: 11.12.2020).
13. Lee J.S., Agrawal S., von Turkovich M., Taatjes D.J., Walz D.A., Jena B.P. Water channels in platelet volume regulation. *J. Cell. Mol. Med*. 2012. vol. 4. no. 16. P. 945-949.