

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ТРОМБОЦИТЫ КРЫС IN VITRO

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

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, e-mail: o.pakhrova@bk.ru

Важнейшими участниками нормального гемостаза и патологического тромботического процесса являются тромбоциты. Факторы, способствующие их активации, вызывают ряд структурно-функциональных изменений, проявляющихся модификацией формы и размеров кровяных пластинок. Для более полной характеристики гуморальной регуляции гемостаза необходимо выявление особенностей морфологии тромбоцитов при действии веществ, изменяющих их функциональную активность. Нами исследовались особенности влияния лактата (рН 7,2 и 7,0), оксида азота (нитропруссид натрия в концентрациях 100 и 1000 мкмоль/л) и глутамата натрия (100 и 1000 мкмоль/л) на морфологические параметры тромбоцитов *in vitro* у крыс. Определялись большой и малый диаметры, площадь, индекс элонгации кровяных пластинок, индекс омоложения, количество тромбоцитов с грануломером и степень насыщения их гранулами. Результаты исследования показали, что лактат-ацидоз вызывает увеличение индекса элонгации и уменьшение количества тромбоцитов с грануломером. Морфофункциональные изменения тромбоцитов под влиянием NO проявляются уменьшением размеров пластинок, количества молодых форм и повышением числа дегранулированных тромбоцитов, что свидетельствует о снижении их активности. Влияние глутамата выражается в удлинении, увеличении площади и уменьшении степени насыщения тромбоцитов гранулами. Выявленные особенности отражают характер влияния используемых веществ на функциональную активность кровяных пластинок и могут быть обусловлены изменением концентрации цитозольного кальция.

Ключевые слова: морфология тромбоцитов, лактат, оксид азота, глутамат.

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE HUMORAL FACTORS INFLUENCE TO RAT PLATELETS IN VITRO

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

¹Ivanovo State Medical Academy Ministry of Health of Russia, Ivanovo, e-mail: o.pakhrova@bk.ru

The most important participants in the normal hemostasis and the pathological thrombotic process are platelets. The factors contributing to their activation cause a number of structural and functional changes that are manifested by modification of the shape and sizes of blood plates. The identification of the platelet morphology features under the action of substances that change their functional activity is necessary for a more complete characteristic of the humoral regulation of hemostasis. We have studied the features of the influence of lactate (pH 7.2 and 7.0), nitrogen oxide (sodium nitroprusside in concentrations of 100 and 1000 $\mu\text{mol} / \text{l}$) and sodium glutamate (100 and 1000 $\mu\text{mol} / \text{l}$) on the morphological parameters of rat platelets *in vitro*. The large and small diameter, the area, the elongation index of blood plates, the rejuvenation index, the amount of platelets with the granoomer and the degree of saturation of their granules are determined. The results of the study showed that lactat-acidosis causes an increase in the elongation index and a decrease in the number of platelets with the granoomer. Morphofunctional changes in platelets under the influence of NO are manifested by a decrease in the size of the plates, the number of young forms and an increase in the number of degraded platelets, which indicates a decrease in their activity. The influence of glutamate is expressed in lengthening, increasing the area and decrease the degree of platelet saturation with granules. The identified features reflect the nature of the influence of the substances used on the functional activity of blood plates and can be due to a change in the concentration of cytosolic calcium.

Keywords: platelet morphology, lactate, nitrogen oxide, glutamate.

Тромбоциты представляют собой безъядерные структуры дисковидной формы диаметром 1–4 мкм и толщиной 0,8 мкм, образующиеся из мегакариоцитов. Основной функцией кровяных пластинок является остановка кровотечения посредством образования тромбоцитарного тромба [1]. Морфологически пластинки состоят из ряда структурных

органелл, таких как плазматическая мембрана, открытая канальцевая система, эндоплазматический ретикулум, который образует плотную трубчатую систему, мембранный каркас на основе спектрина, актиновый цитоскелет, микротрубочки, и других элементов, таких как альфа-гранулы, плотные гранулы, пероксисомы, лизосомы и митохондрии. Плотная трубчатая система секвестрирует ионизированный кальций. Во время активации тромбоцитов запускается каскад реакций, приводящий к увеличению содержания цитозольного кальция, перестройке цитоскелета и высвобождению содержимого гранул тромбоцитов [2]. Происходит увеличение объема и изменение формы пластинок из дисковидной в сферическую с псевдоподиями.

Активность кровяных пластинок во многом определяется влиянием гуморальных факторов экзогенного и эндогенного происхождения. Так, гипоксия тканей и активация анаэробного метаболизма приводят к образованию большого количества лактата. Показано, что при уменьшении рН до 7,25 у кошек в сосудах наблюдаются агрегация форменных элементов крови, образование тромбов. Повреждение эндотелия, обусловленное увеличением количества внутриклеточной жидкости, стимулирует агрегацию тромбоцитов [3]. Согласно другим данным, молочная кислота увеличивает время свертывания крови и снижает агрегацию тромбоцитов [4]. При ишемии и инсульте в очагах их локализации и в крови всегда в больших количествах присутствует глутамат, являющийся одним из основных нейромедиаторов. Тромбоциты поглощают глутамат из плазмы через возбуждающие аминокислотные транспортеры и сохраняют его в плотных бета-гранулах. При активации тромбоцитов посредством экзоцитоза бета-гранул высвобождается большое количество глутамата, благодаря чему увеличиваются его локальные концентрации [5]. Показано, что предварительная обработка тромбоцитов глутаматом (100–1000 мкМ) стимулирует активацию тромбоцитов и высвобождение внутриклеточных везикул [6]. Вырабатываемый эндотелиальными клетками оксид азота (NO) не только расширяет кровеносные сосуды, но также ингибирует адгезию и агрегацию тромбоцитов. Образование оксида азота катализирует NO-синтаза. Сбой этого процесса может привести к нарушению продукции NO, последствиями чего могут явиться повышение тонуса сосудов и активация тромбоцитов, что способствует развитию атеросклероза и нарушению кровообращения [7]. Инкубация тромбоцитов с экзогенным донатором NO (нитропруссидом натрия) в концентрации 100 мкмоль/л приводит к уменьшению их агрегационной способности, морфологическим изменениям и снижению осмотической стойкости [8]. Актуальным является выявление закономерностей морфологической модификации тромбоцитов при действии гуморальных факторов, модулирующих уровень их функциональной активности, что позволит охарактеризовать особенности структурно-функциональных изменений кровяных пластинок

под влиянием различных веществ и расширить представления о механизме гуморальной регуляции гемостаза.

Цель исследования: выявить особенности влияния, оказываемого снижением рН, вызванного введением лактата, оксида азота и глутамата натрия, на морфологические параметры тромбоцитов *in vitro* у крыс.

Материалы и методы исследования

В экспериментах *in vitro* было использовано 30 беспородных крыс-самцов массой 300–340 г. Все манипуляции проводились с соблюдением биоэтических принципов в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123, Страсбург, 1986 г.). Кровь брали под наркозом (1–2 мг золетила на 100 г массы) из левого желудочка сердца в вакутейнеры, содержащие цитрат натрия (3,8%) в соотношении 9:1. Эвтаназия осуществлялась посредством дислокации шейных позвонков, после чего проводился забор крови из левого желудочка. Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы цитратную кровь центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин (центрифуга Liston С 2204, Россия). Было проведено 3 серии экспериментов, позволяющих оценить особенности влияния лактата (n=7), нитропрусида натрия (НПН) в качестве экзогенного донатора оксида азота (n=14) и глутамата натрия на морфологические характеристики тромбоцитов (n=9). Для этого в каждой серии исследований тромбоцитарную плазму делили на 3 аликвоты (по 0,5 мл), в первую из которых в качестве контроля добавляли 0,1 мл физиологического раствора. В остальные пробирки добавляли либо раствор молочной кислоты на физиологическом растворе для получения рН 7,2 и 7,0, либо НПН в конечной концентрации в инкубационной среде 100 мкмоль/л и 1000 мкмоль/л, либо глутамат натрия в конечной концентрации 100 мкмоль/л и 1000 мкмоль/л. Все пробирки инкубировали 15 мин при температуре 37°C (термостат ТВ-80-1, Россия), после чего готовили мазки тромбоцитарной плазмы и окрашивали их азур-2-эозином по Романовскому.

Морфологическое исследование проводилось с помощью компьютерной цитоморфометрии (программа анализа и обработки изображений GNU Image Manipulation Program, GIMP 2.10.14, США) на основе анализа микрофотографий, сделанных при использовании иммерсионного объектива (микроскоп Ломо Микмедво-1, Россия) и цифровой окулярной камеры. Измеряли такие морфометрические параметры, как большой и малый диаметры кровяной пластинки (длина и ширина соответственно), ее площадь и индекс элонгации (ИЭ). $ИЭ = (L - W) / (L + W)$, где L – длина, W – ширина тромбоцита. Определяли процент тромбоцитов, содержащих в цитоплазме грануломер. Расчет производился на 500 клетках. В препаратах, окрашенных по Романовскому, гранулы тромбоцитов окрашиваются в

красно-фиолетовый цвет. Соотношение выраженности синего и красного оттенков позволяет оценить степень зрелости кровяных пластинок. Преобладание в препарате цветов синего спектра отражает увеличение доли «молодых» пластинок. Большая выраженность красного цвета, напротив, свидетельствует о нарастании содержания «старых» тромбоцитов. Соотношение «молодых» и «старых» кровяных пластинок позволяет определить индекс омоложения тромбоцитов (ИОТр). Зеленая компонента цветового спектра отражает удельную оптическую плотность пластинок, определяемую степенью насыщения их гранулами, что, в свою очередь, характеризует уровень функциональной активности.

Вариационный анализ полученных результатов проводился в электронных таблицах Excel и программе Statistica с расчетом t-критерия Стьюдента, а также непараметрического критерия парных сравнений Вилкоксона. Нормальность распределения оценивалась на основании критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены в виде средней арифметической и ошибки средней ($M \pm m$). Статистическая значимость различий соответствовала $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Морфологический анализ мазков плазмы, обогащенной тромбоцитами, показал, что смещение рН среды в кислую сторону сопровождается удлинением кровяных пластинок (табл. 1).

Таблица 1

Морфологические параметры тромбоцитов после инкубации с лактатом *in vitro* ($M \pm m$), $n=7$

Показатель	Контроль	Лактат рН 7,2	Лактат рН 7,0
Длина тромбоцита, мкм	3,04±0,08	3,50±0,15 *	3,51±0,05 *
Ширина тромбоцита, мкм	2,00±0,05	1,91±0,05	1,94±0,3
Площадь тромбоцита, мкм ²	4,79±0,24	5,24±0,19	5,36±0,12
ИЭ, у.е.	0,21±0,01	0,29±0,03*	0,29±0,01*
ИОТр, у.е.	1,21±0,05	1,26±0,07	1,27±0,10
Количество тромбоцитов с грануломером в препарате, %	69,39±3,34	48,00±3,70 *	44,7±3,5 *

Примечание: (здесь и далее)* – достоверные отличия по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Большой диаметр тромбоцитов, инкубированных с лактатом, возрастает как при рН 7,2 ($p=0,005$), так и при рН 7,0 ($p<0,0008$) по сравнению с контролем (рН 7,4). Уже при значении рН 7,2 наблюдается четкая тенденция к увеличению индекса элонгации ($p=0,02$), сохраняющаяся при рН 7,0 ($p=0,0004$). Возможно, при лактат-ацидозе происходит увеличение ионной проницаемости мембраны и концентрации цитозольного кальция, что способствует

изменению ферментативной активности, белковой структуры цитоскелета и удлинению кровяных пластинок без увеличения их объема [9]. Однако количество тромбоцитов с грануломером по сравнению с контролем уменьшается при рН 7,2 ($p=0,002$) и при рН 7,0 ($p=0,001$), отражая уменьшение численности активных пластинок, что может быть связано с повреждающим влиянием высокой концентрации водородных ионов на мембрану тромбоцитов и с выбросом содержимого гранул в окружающее пространство.

Нитропруссид натрия, напротив, вызывает уменьшение морфологических параметров тромбоцитов *in vitro*, нарастающее при увеличении концентрации вещества в инкубационной среде, без изменения индекса элонгации (табл. 2).

Таблица 2

**Морфологические параметры тромбоцитов
после инкубации с нитропруссидом натрия *in vitro* ($M \pm m$), $n=14$**

Показатель	Контроль	НПН	
		100 мкмоль/л	1000 мкмоль/л
Длина тромбоцита, мкм	4,37±0,10	3,96±0,06*	3,70±0,19*
Ширина тромбоцита, мкм	2,36±0,10	2,22±0,04	1,85±0,08*
Площадь тромбоцита, мкм ²	8,15±0,48	6,90±0,15	5,43±0,46*
ИЭ, у.е.	0,30±0,01	0,29±0,01	0,33±0,02
ИОТр, у.е.	1,37±0,07	1,11±0,03*	1,20±0,07
Количество тромбоцитов с грануломером в препарате, %	68,57±2,55	64,43±1,94	48,00±2,76*

Так, большой диаметр кровяных пластинок статистически значимо уменьшаются после инкубации с 100 мкмоль/л и 1000 мкмоль/л раствора НПН ($p=0,001$ и $p=0,01$ соответственно). Максимальная концентрация донатора NO вызывает достоверное уменьшение малого диаметра и площади тромбоцитов по сравнению с контрольными значениями ($p=0,0008$ и $p=0,0008$ соответственно). При этом использование уже минимальной концентрации вещества сопровождается увеличением в препаратах доли оттенков красного спектра до 0,42±0,01 у.е. при 0,36±0,02 у.е. в контроле ($p=0,006$) и снижением ИОТр ($p=0,002$), что указывает на уменьшение количества «молодых», активных пластинок. Влияние раствора НПН в концентрации 1000 мкмоль/л проявляется снижением выраженности зеленого цвета в препарате до 0,38±0,01 у.е. по сравнению с контрольным показателем, равным 0,43±0,01 у.е., ($p=0,01$), и уменьшением количества тромбоцитов, содержащих грануломер ($p=0,0001$).

Эффект действия NO на тромбоциты связан с активацией гуанилатциклазы. Увеличение концентрации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), вызванное оксидом

азота, тормозит освобождение арахидоновой кислоты, угнетая процесс активации фосфолипаз A₂ и C, что предотвращает распад мембранных фосфолипидов. В результате ингибируются адгезия и агрегация тромбоцитов через торможение накопления свободного кальция в клетках. В условиях низкой активности фосфолипазы C нарушается образование инозитол-3-фосфата и диацилглицерола, которые являются специфическими вторичными посредниками, открывающими SMOC (вторично-управляемые каналы) и SOCC (депо-управляемые кальциевые каналы). Нарушения в работе этих каналов приводят к снижению притока кальция из внутриклеточных депо. Ионы кальция являются необходимым внутриклеточным регулятором. Нарастание концентрации этих ионов в цитоплазме играет ключевую роль в определении функциональной активности тромбоцитов, связанной с их агрегацией и реакцией высвобождения, а снижение – с дезагрегацией. Уменьшение содержания свободного кальция в тромбоцитах служит основной причиной нарушения процесса их активации. Кроме того, влияние метаболитов NO, инициирующих реакции свободнорадикального окисления, проявляется структурными преобразованиями мембраны кровяных пластинок (реорганизации актиновой сети и белков цитоскелета), вероятно, приводящими к ее повреждению с последующим разрушением и появлением тромбоцитов меньших размеров [10].

Инкубация с глутаматом натрия в конечной концентрации 100 мкмоль/л и 1000 мкмоль/л сопровождается увеличением длины тромбоцитов по сравнению с контролем ($p=0,02$ и $p=0,004$ соответственно), их площади ($p=0,05$ и $p=0,01$ соответственно) и индекса элонгации ($p=0,003$ и $p=0,03$ соответственно) (табл. 3). Влияние глутамата на кровяные пластинки определяется взаимодействием его с глутаматными N-метил-d-аспартат (NMDA)-рецепторами [11]. Стимуляция глутаматных NMDA-рецепторов нарушает ионный гомеостаз, способствует проникновению в клетку катионов, таких как Na⁺ и Ca²⁺. Возникающая деполяризация клеточной мембраны приводит к открытию Ca²⁺-каналов, которые дополнительно увеличивают уровень внутриклеточного Ca²⁺. Увеличение цитозольного кальция стимулирует кальций-зависимые процессы, повышая активность различных ферментов, таких как протеинкиназы, фосфолипазы, протеазы, синтаза оксида азота, усиливается продукция арахидоновой кислоты, высокий уровень которой генерирует активные формы кислорода и азота. Образующийся пероксинитрит вызывает изменения структуры сократительных белков цитоплазматического матрикса и увеличение размеров тромбоцитов [9]. Нарастание концентрации ионов кальция в цитоплазме играет ключевую роль в активации тромбоцитов, связанной с их агрегацией и реакцией высвобождения [6].

Таблица 3

**Морфологические параметры тромбоцитов
после инкубации с глутаматом натрия *in vitro* (M±m), n=9**

Показатель	Контроль	Глутамат 100 мкмоль/л	Глутамат 1000 мкмоль/л
Длина тромбоцита, мкм	3,06±0,08	3,79±0,23 *	3,55±0,12 *
Ширина тромбоцита, мкм	2,02±0,04	2,18±0,10	2,13±0,06
Площадь тромбоцита, мкм ²	4,87±0,19	6,57±0,69*	5,95±0,31 *
ИЭ, у.е.	0,20±0,01	0,27±0,01 *	0,25±0,02 *
ИОТр, у.е.	1,28±0,08	1,31±0,09	1,23±0,13
Количество тромбоцитов с грануломером в препарате, %	74,4±3,27	65,83±3,16	61,50±4,08 *

На фоне относительно стабильного ИОТр количество тромбоцитов, содержащих в цитоплазме грануломер, прогрессирующе снижается. При концентрации глутамата натрия 1000 мкмоль/л различие с контрольным показателем становится статистически значимым ($p=0,03$). Одновременно наблюдается уменьшение в препарате доли зеленого цвета до $0,39\pm 0,01$ у.е. по сравнению с контролем, составляющим $0,43\pm 0,01$ у.е. ($p=0,01$), что свидетельствует об уменьшении степени насыщения тромбоцитов гранулами, характеризующем снижение их функциональной активности. Возможно, это связано с завершившейся дегрануляцией активированных в присутствии глутамата пластинок и последующим уменьшением их функционального потенциала.

Таким образом, эффекты лактата, нитропрусида натрия и глутамата на морфологические параметры тромбоцитов отражают особенности изменения функциональной активности кровяных пластинок и проявляются изменением их площади, индекса элонгации, а также количества активных форм, что, вероятно, определяется характером влияния вещества на концентрацию внутриклеточного кальция.

Работа является частью комплексного исследования, выполняемого в соответствии с государственным заданием ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России на 2021 год «Функциональный резерв гемостаза и реологии крови при гипоксических состояниях в норме и патологии».

Список литературы

1. de Queiroz M.R., de Sousa B.B., da Cunha Pereira D.F., Mamede C.C.N., Matias M.S., de Morais 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. vol. 133. P. 33-47. DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.04.013.
2. Thon T.J., Italiano J.E. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2012, vol. 210. P. 3-22. DOI: 10.1007/978-3-642-29423-5_1.

3. Альфонсова, Е.В., Кузник Б.И. Влияние метаболического ацидоза на структурную организацию эндотелия // *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10-8. С. 1451-1455.
4. Hanke A.A., Dellweg C., Kienbaum P., Weber C.F., Görlinger K., Rahe-Meyer N. Effects of desmopressin on platelet function under conditions of hypothermia and acidosis: an in vitro study using multiple electrode aggregometry. *Anaesthesia*. 2010. vol. 65. P. 688–691. DOI: 10.1111/j.1365-2044.2010.06367.x
5. Kasatkina L.A., Borisova T.A. Glutamate release from platelets: exocytosis versus glutamate transporter reversal. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 2013. vol. 45. P.2585–2595. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.08.004.
6. Kalev-Zylinska M.L., Morel-Kopp M.C., Ward C.M., Hearn J.I., Hamilton J.R., Bogdanova A.Y. Ionotropic glutamate receptors in platelets: opposing effects and a unifying hypothesis. *Platelets*. 2020. vol. 7. P.1-11. DOI: 10.3390/ijms21218398.
7. Hong F.F., Liang X.Y., Liu W., Lv S., He S.J., Kuang H.B, Yang S.L. Roles of eNOS in atherosclerosis treatment. *Inflamm Res*. 2019. vol. 68. no. 6. P. 429-441. DOI: 10.1007/s00011-019-01229-9.
8. 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: 12.12.2021).
9. 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. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.015036.
10. Apostoli G.L., Solomon A., Smallwood M.J., Winyard P., Emersonl M. Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 2014. vol. 12. P. 1880-1889. DOI: 10.1111/jth.12711.
11. Kalev-Zylinska M.L., Green T.N., Morel-Kopp M.C., Zheng Z., Ting-Yu Chen,. Hearn J., Peng Sun,. Flanagan J., Young D, Barber P., During M., Ward C., Kalev-Zylinska M. N-methyl-D-aspartate receptors amplify activation and aggregation of human platelets. *Thrombosis Research*. 2014. vol.133. no. 5. P. 837-847. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.02.011.