

МОРФОЛОГИЯ И ОНТОГЕНЕЗ ЖИВОТНЫХ

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТРОМБОЦИТОВ У МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ВОЗРАСТЕ ОТ 3 ДО 12 МЕСЯЦЕВ

С.Ю. Завалишина, И.Н. Медведев

Курский институт социального образования
(филиал) Российского государственного социального университета
ул. К. Маркса, 53, Курск, Россия, 305029

В работе представлены свойства тромбоцитов молодняка крупного рогатого скота, установлена высокая активность антиоксидантной защиты тромбоцитов, усиление актино-миозинового механизма, высокое количественное содержание в них аденозинфосфатов и выраженная их секреция в процессе активации и агрегации.

Ключевые слова: молодняк, телята, тромбоциты, агрегация, секреция.

В настоящее время достигнуто понимание большого значения системы гемостаза в нормальном формировании адаптивных возможностей организма [1]. При этом важную роль в создании оптимальных условий для микроциркуляции, необходимой для роста, развития и максимально возможного проявления в фенотипе продуктивных свойств животных, играют кровяные пластинки за счет их способности к агрегации, оказывающей влияние на текучесть крови и тем самым на ее приток к тканям [2].

Конечным этапом раннего онтогенеза телят является фаза растительного питания [3], в течение которой происходит окончательное созревание всех его органов и систем. При этом, несмотря на значимость данной фазы в развитии животного, остается не изученным такой важный компонент гемостаза, как агрегационная способность тромбоцитов в просвете сосуда. Кроме того, не выяснена интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тромбоцитах и уровень функциональной способности их антиокислительных ферментов. В этой связи цель настоящего исследования состояла в установлении функциональных особенностей гемостатической активности тромбоцитов у молодняка крупного рогатого скота в возрасте от 3 до 12 месяцев.

Материалы и методы. Под наблюдением находились бычки ($n = 39$), содержащиеся на стандартном рационе кормления. У животных оценивали основные физиологические показатели и проводили клинический и биохимический анализы

крови, результаты которых использовали как исходные значения в сроки 3, 6, 9 и 12 мес. Тромбоциты получали путем отмывания и ресуспендирования [4] с последующей оценкой в них уровня малонового диальдегида (МДА) в реакции восстановления тиобарбитуровой кислотой [5] с установлением содержания ацилгидроперекисей (АГП) [6].

Оценивали функциональные возможности внутритромбоцитарных ферментов антиокисления — каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) [7]. В тромбоцитах выявляли содержание аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ) с оценкой величины их секреции под влиянием коллагена. Белковый состав цитоскелета кровяных пластинок (актин и миозин) устанавливали в условиях активации и агрегации тромбоцитов с АДФ и тромбином [8]. Число тромбоцитов в крови животных подсчитывали в камере Горяева. Агрегацию тромбоцитов (АТ) регистрировали визуальным микрометодом [9] с применением ряда индукторов: АДФ ($0,5 \cdot 10^{-4}$ М), коллагена (разведение 1:2 основной суспензии), тромбина ($0,125$ ед/мл), ристомицина ($0,8$ мг/мл), H_2O_2 ($7,3 \cdot 10^{-4}$ М), адреналина ($5 \cdot 10^{-4}$ М) и их сочетаний (АДФ и адреналин; АДФ и коллаген; адреналин и коллаген; АДФ и тромбин; АДФ, коллаген и адреналин; АДФ, тромбин и адреналин; АДФ, коллаген, тромбин и адреналин).

Выраженность внутрисосудистой активности тромбоцитов (ВАТ) устанавливалась визуальным методом с применением фазово-контрастного микроскопа [10]. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики.

Результаты исследования. Исследования функциональных свойств тромбоцитов у молодняка животных продемонстрировали постепенное их созревание: так, содержание АГП в кровяных пластинках телят 3 месячного возраста ($2,92 \pm 0,12 D_{233}/10^9$ тр.), постепенно снижаясь, к 12 мес. составило $2,63 \pm 0,13 D_{233}/10^9$ тр. Количество МДА в тромбоцитах в 3 мес. у телят было на уровне $0,90 \pm 0,11$ нмоль/ 10^9 тр., также постепенно уменьшаясь, к 12 мес. жизни оно составило $0,73 \pm 0,14$ нмоль/ 10^9 тр. Активности каталазы и СОД тромбоцитов у наблюдаемых животных постепенно возрастали — с $9720,1 \pm 10,12$ МЕ/ 10^9 тр. до $10\ 196,3 \pm 14,34$ МЕ/ 10^9 тр. и с $1680,3 \pm 3,65$ МЕ/ 10^9 тр. до $1950,3 \pm 3,32$ МЕ/ 10^9 тр., соответственно.

Низкая активность свободнорадикальных процессов в раннем онтогенезе у телят во многом обеспечивает выявленное у них оптимальное функционирование механизмов активации кровяных пластинок с 3 мес. по 12 мес. жизни, в том числе оптимальность процесса самосборки актино-миозинового комплекса, а также и количественного содержания в тромбоцитах и секреции из них АДФ и АТФ. В течение срока наблюдения содержание АТФ и АДФ в тромбоцитах здоровых телят постепенно нарастало — с $5,72 \pm 0,16$ мкмоль/ 10^9 тр. до $5,81 \pm 0,18$ мкмоль/ 10^9 тр. и с $3,56 \pm 0,10$ мкмоль/ 10^9 тр. до $3,64 \pm 0,17$ мкмоль/ 10^9 тр., соответственно. Выраженность секреции АТФ и АДФ под воздействием коллагена из тромбоцитов с 3 мес по 12 мес. жизни увеличивалась на 7,6% и 9,2%, соответственно (табл. 1).

Содержание актина и миозина в тромбоцитах телят

Параметры	Возраст, мес.			
	3	6	9	12
Актин ($M \pm m$)				
В интактном состоянии, % к общему содержанию белка	$34,0 \pm 0,18$	$35,2 \pm 0,12$	$36,3 \pm 0,09$	$37,0 \pm 0,14$
На фоне АДФ активации, % к общему содержанию белка	$34,2 \pm 0,16$	$36,1 \pm 0,14$	$37,4 \pm 0,19$	$38,3 \pm 0,22$
На фоне АДФ агрегации, % к общему содержанию белка	$42,9 \pm 0,24$	$43,5 \pm 0,19$	$44,2 \pm 0,09$	$45,6 \pm 0,20$
На фоне тромбин активации, % к общему содержанию белка	$37,1 \pm 0,23$	$37,9 \pm 0,25$	$39,2 \pm 0,20$	$40,3 \pm 0,17$
На фоне тромбин агрегации, % к общему содержанию белка	$31,4 \pm 0,12$	$33,5 \pm 0,16$	$35,7 \pm 0,17$	$37,6 \pm 0,22$
Миозин ($M \pm m$)				
В интактном состоянии, % к общему содержанию белка	$15,3 \pm 0,14$	$16,1 \pm 0,18$	$16,9 \pm 0,09$	$17,5 \pm 0,11$
На фоне АДФ активации, % к общему содержанию белка	$21,4 \pm 0,16$	$23,0 \pm 0,18$	$24,7 \pm 0,20$	$25,6 \pm 0,15$
На фоне АДФ агрегации, % к общему содержанию белка	$29,9 \pm 0,15$	$30,8 \pm 0,12$	$31,7 \pm 0,09$	$33,6 \pm 0,18$
На фоне тромбин активации, % к общему содержанию белка	$36,1 \pm 0,14$	$37,9 \pm 0,15$	$38,5 \pm 0,23$	$39,7 \pm 0,19$
На фоне тромбин агрегации, % к общему содержанию белка	$44,8 \pm 0,23$	$45,6 \pm 0,20$	$47,3 \pm 0,16$	$49,0 \pm 0,18$

Примечание. Достоверных различий между учитываемыми возрастными не найдено.

Количество актина в тромбоцитах 3 мес. телят соответствовало $34,0 \pm 0,18\%$ к общему белку в тромбоците, увеличиваясь к 1 году жизни до $37,0 \pm 0,14\%$. Выявлена выраженность дополнительного образования актина у телят при активации кровяных пластинок сильным или слабым индуктором и при их агрегации также увеличивалась в течение всего срока наблюдения. Сходная динамика активности в тромбоцитах наблюдаемых телят выявлена и для миозинового компонента. Отмечено, что в неактивированных кровяных пластинках телят на 3 мес. жизни количество миозина достигает $15,3 \pm 0,14\%$ к общему содержанию белка в тромбоците, постепенно возрастая и составляя в 12 мес. жизни $17,5 \pm 0,11\%$.

На фоне активации и агрегации тромбоцитов сильным или слабым индукторами у здоровых телят в течение всей фазы растительного питания постепенно увеличивается выраженность дополнительной самосборки миозина (см. табл. 1).

У наблюдаемых телят, начиная с 3 мес. возраста, отмечено постепенное сокращение времени развития АТ со всеми примененными индукторами и их сочетаниями (см. табл. 2).

Агрегация тромбоцитов (АТ) в ответ на коллаген развивалась в начале исследований за $26,7 \pm 0,14$ с., немного ускоряясь к их окончанию, сокращение времени развития АТ у наблюдаемых животных отмечено также под влиянием АДФ и ристомицина. Немного более замедленно АТ возникала с H_2O_2 , тромбином и адреналином; время развития АТ с ними также имело тенденцию к сокращению за период наблюдений.

Агрегационная способность тромбоцитов телят *in vitro* и *in vivo*

Параметры	Возраст, мес.			
	3	6	9	12
Агрегация <i>in vitro</i> (время развития агрегации тромбоцитов с данным индуктором, сек.) ($M \pm m$)				
АДФ	35,9 ± 0,19	34,8 ± 0,21	33,5 ± 0,09	32,8 ± 0,15
Коллаген	26,7 ± 0,14	26,0 ± 0,12	25,2 ± 0,17	23,6 ± 0,19
Тромбин	49,4 ± 0,09	48,3 ± 0,08	46,9 ± 0,20	45,5 ± 0,15
Ристомицин	44,2 ± 0,11	42,9 ± 0,16	41,3 ± 0,23	40,4 ± 0,14
H ₂ O ₂	38,2 ± 0,14	36,8 ± 0,12	35,2 ± 0,09	34,1 ± 0,18
Адреналин	92,0 ± 0,23	90,2 ± 0,17	89,1 ± 0,26	87,8 ± 0,19
АДФ + адреналин	33,0 ± 0,08	32,4 ± 0,12	31,6 ± 0,10	30,4 ± 0,14
АДФ + коллаген	24,8 ± 0,09	24,0 ± 0,11	22,9 ± 0,14	21,2 ± 0,07
Адреналин + коллаген	25,2 ± 0,08	23,7 ± 0,15	22,5 ± 0,20	22,0 ± 0,13
АДФ + тромбин	23,5 ± 0,09	23,0 ± 0,14	22,4 ± 0,10	21,8 ± 0,12
АДФ + коллаген + адреналин	20,1 ± 0,07	19,2 ± 0,09	18,6 ± 0,07	18,0 ± 0,11
АДФ + тромбин + адреналин	19,7 ± 0,10	19,1 ± 0,16	18,4 ± 0,09	17,2 ± 0,13
АДФ + коллаген + тромбин + адреналин	16,8 ± 0,08	16,3 ± 0,05	15,8 ± 0,11	15,3 ± 0,15
Агрегация <i>in vivo</i> ($M \pm m$)				
Дискоциты, %	74,0 ± 0,25	73,1 ± 0,14	72,2 ± 0,19	71,1 ± 0,23
Сумма активных форм, %	26,0 ± 0,12	26,9 ± 0,15	27,8 ± 0,19	29,9 ± 0,13
Число тромбоцитов в агрегатах, %	5,8 ± 0,09	6,0 ± 0,06	6,1 ± 0,11	6,3 ± 0,08
Число малых агрегатов по 2—3 тромбоцита на 100 свободно лежащих тромбоцитов	5,4 ± 0,05	5,5 ± 0,10	5,8 ± 0,19	5,9 ± 0,12
Число средних и больших агрегатов по 4 и более тромбоцита на 100 свободно лежащих тромбоцитов	0,17 ± 0,06	0,19 ± 0,08	0,21 ± 0,05	0,23 ± 0,09

Примечание. Достоверных различий между учитываемыми возрастными группами не найдено.

Найденное ускорение АТ у телят при оценке АТ с одним индуктором согласовалось с установленным фактом ускорения АТ в условиях применения двух или трех агонистов одновременно. Из табл. 2 видно, что оценка АТ с отдельными индукторами и их сочетаниями позволила установить у телят в фазу растительного питания возрастное усиление агрегативной способности кровяных пластинок.

Ускорение в течение срока наблюдения АТ с сильными индукторами агрегации — коллагеном и тромбином — указывало на активизацию в них фосфолипазы С, обеспечивающей фосфоинозитольный путь стимуляции тромбоцитов через повышение количества диацилглицерола и протеинкиназы С с интенсификацией самосборки актина и миозина в кровяных пластинках. Сокращение времени АТ и со слабыми индукторами агрегации — АДФ — указывало на повышение доступности рецепторов к ним и/или увеличение их числа на поверхности тромбоцитов при активизации экспрессии фибриногеновых рецепторов (GPIIb-IIIa) и повышении функциональных возможностей фосфолипазы А₂, обеспечивающей высвобождение арахидоновой кислоты из мембран кровяных пластинок для синтеза тромбоксана А₂.

Без сомнения, в основе выявленного ускорения АТ с испытанными комбинациями индукторов лежит одновременное включение ферментных систем тромбоцитов, задействованных при агрегации с отдельными агонистами.

Найденная при оценке *in vitro* возрастная динамика активности тромбоцитов подтверждалась результатами исследования ВАТ. Так, число дискоцитов в крови у телят на 3 мес. жизни составляло $74,0 \pm 0,25\%$, постепенно испытывая тенденцию к снижению до конца исследований (в 12 мес. — $71,1 \pm 0,23\%$). Суммарное содержание активных форм тромбоцитов постепенно повышалось за время наблюдения на 15,0%. В крови телят за время наблюдения число свободноперемещающихся малых и больших агрегатов тромбоцитов постепенно увеличивалось с $5,4 \pm 0,05$ и $0,17 \pm 0,06$ на 100 свободно лежащих тромбоцитов в начале наблюдения до $5,9 \pm 0,12$ и $0,23 \pm 0,09$ на 100 свободно лежащих тромбоцитов в его конце. Количество включенных в агрегаты тромбоцитов у телят в течение периода наблюдений возросло на 8,6%. Выявленное постепенное увеличение ВАТ в течение фазы растительного питания раннего онтогенеза телят указывало также на усиление экспрессии на их мембранах фибриногеновых рецепторов (GPIIb-IIIa), подтверждая повышение чувствительности их поверхностных рецепторов к облигатно присутствующим в крови индукторам агрегации (АДФ, тромбин, адреналин) и активизацию интратромбоцитарных механизмов агрегации.

Таким образом, у молодняка в возрасте от 3 до 12 мес. постепенно повышается способность тромбоцитов к агрегации, а также сумма их активированных форм и свободно перемещающихся по крови агрегатов всех размеров.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. — Чита: Экспресс-издательство, 2010.
- [2] Завалишина С.Ю. Функциональное состояние системы гемостаза у новорожденных телят // Ветеринария. — 2011. — № 6. — С. 42—45.
- [3] Медведев И.Н., Завалишина С.Ю. Активность системы гемостаза у телят молочно-растительного питания // Доклады РАСХН. — 2012. — № 6. — С. 62—65.
- [4] Ястребов Г.Н. Метод выделения тромбоцитов для изучения их липидного состава // Лабораторное дело. — 1985. — № 2. — С. 93—95.
- [5] Кубатиев А.А., Андреев С.В. Перекиси липидов и тромбоз // Бюллетень экспериментальной биол. и медицины. — 1979. — № 5. — С. 414—417.
- [6] Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. — 1983. — № 3. — С. 33—36.
- [7] Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. — 1991. — № 10. — С. 9—13.
- [8] Ермолаева Т. А., Головина О.Г., Морозова Т.В. Программа клинико-лабораторного обследования больных тромбоцитопатиями. — СПб., 1992.
- [9] Шитикова А.С. Визуальный микрометод исследования агрегации тромбоцитов // Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний / Петрищев Н.Н., Папаян Л.П. (ред.). — СПб., 1999. — С. 49—53.
- [10] Шитикова А.С., Тарковская Л.Р., Каргин В.Д. Метод определения внутрисосудистой активации тромбоцитов и его значение в клинической практике // Клиническая и лабораторная диагностика. — 1997. — № 2. — С. 23—35.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF PLATELETS FROM YOUNG CATTLE AGED FROM 3 TO 12 MONTHS

S.Y. Zavalishina, I.N. Medvedev

Kursk Institute of Social Education
(branch of) Russian State Social University
Karl Marx str., 51, Kursk, Russia, 305029

The work presents the properties of platelets young cattle, their high antioxidant activity of platelets, increased actin-myosin mechanism, high quantitative maintenance of adenosine phosphate and expressed their secretion during activation and aggregation.

Key words: young calves, platelet, aggregation, and secretion.

REFERENCES

- [1] *Kuznik B.I.* Kletochnye i molekulyarnye mehanizmy reguljacji sistemy gemostaza v norme i patologii. — Chita: Jekspress-izdatel'stvo, 2010.
- [2] *Zavalishina S. Ju.* Funkcional'noe sostojanie sistemy gemostaza u novorozhdennyh teljat // *Veterinarija*. — 2011. — № 6. — S. 42—45.
- [3] *Medvedev I.N., Zavalishina S. Ju.* Aktivnost' sistemy gemostaza u teljat molochno-rastitel'nogo pitaniya // *Doklady RASHN*. — 2012. — № 6. — S. 62—65.
- [4] *Jastrebov G.N.* Metod vydeleniya trombocitov dlja izuchenija ih lipidnogo sostava // *Laboratornoe delo*. — 1985. — № 2. — S. 93—95.
- [5] *Kubatiev A.A., Andreev S.V.* Perekisi lipidov i tromboz // *Bjulleten' jeksperimental'noj biol. i mediciny*. — 1979. — № 5. — S. 414—417.
- [6] *Gavrilov V.B., Mishkorudnaja M.I.* Spektrofotometricheskoe opredelenie sodержanija gidrope-rekisej lipidov v plazme krovi // *Laboratornoe delo*. — 1983. — № 3. — S. 33—36.
- [7] *Chevari S., Andjal T., Shtrenger Ja.* Opredelenie antioksidantnyh parametrov krovi i ih diagnosticheskoe znachenie v pozhilom vozraste // *Laboratornoe delo*. — 1991. — № 10. — S. 9—13.
- [8] *Ermolaeva T.A., Golovina O.G., Morozova T.V.* Programma kliniko-laboratornogo obsledovaniya bol'nyh trombocitopatijami. — SPb., 1992.
- [9] *Shitikova A.S.* Vizual'nyj mikrometod issledovaniya agregacii trombocitov // *Gemostaz. Fiziologicheskie mehanizmy, principy diagnostiki osnovnyh form gemorragicheskikh zabozevanij / Petrishhev N.N., Papajan L.P. (red.)*. — SPb., 1999. — S. 49—53.
- [10] *Shitikova A.S., Tarkovskaja L.R., Kargin V.D.* Metod opredelenija vnutrisudistoj aktivacii trombocitov i ego znachenie v klinicheskoj praktike // *Klinicheskaja i laboratornaja diagnostika*. — 1997. — № 2. — S. 23—35.