

# 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 группами 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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 А<sub>2</sub>, обеспечивающей высвобождение арахидоновой кислоты из мембран кровяных пластинок для синтеза тромбосана А<sub>2</sub>.

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 gidroperekisej 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 obsledovanija bol'nyh trombocitopatijami. — SPb., 1992.
- [9] *Shitikova A.S.* Vizual'nyj mikrometod issledovanija agregacii trombocitov // *Gemostaz. Fiziologicheskie mehanizmy, principy diagnostiki osnovnyh form gemorragicheskikh zaboлеvanij / 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 klinicheskoy praktike // *Klinicheskaja i laboratornaja diagnostika*. — 1997. — № 2. — S. 23—35.