

## Функции крови и онтогенез

УДК 636.2:599.11

### ГЕМОСТАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ У ТЕЛЯТ В ФАЗУ МОЛОЧНОГО ПИТАНИЯ

С.Ю. ЗАВАЛИШИНА

Формирование адаптивных возможностей организма во многом обеспечивается на начальном этапе индивидуального развития. Функциональные способности кровяных пластинок способствуют наилучшей текучести крови и притоку ее достаточного объема к тканям. Мы исследовали возрастную динамику гемостатической активности тромбоцитов у здоровых телят черно-пестрой породы в фазу молочного питания (на 11-е, 15-е, 20-е, 25-е и 30-е сут жизни). У телят отмечена стабильная интенсивность перекисного окисления липидов, устойчивое функционирование актино-миозинового механизма и антиоксидантной защиты тромбоцитов, стабильное содержание аденозинфосфатов и их выраженная секреция в процессе активации и агрегации. Невысокую функциональную активность тромбоцитов регистрировали *in vitro* и *in vivo*. Очевидно, это связано с постоянной активностью рецепторных и пострецепторных механизмов, определяющих функциональную готовность тромбоцитов в условиях растущего влияния окружающей среды на организм животного.

**Ключевые слова:** тромбоциты, агрегация, секреция, актин, миозин, перекисное окисление липидов, телята, фаза молочного питания.

**Keywords:** platelet, aggregation, secretion, actin, myosin, lipid peroxidation, calf, phase of dairy food.

В процессе онтогенеза и становления физиологических показателей у продуктивных животных важное значение имеет активность системы тромбоцитарного гемостаза (1) и определяющих его механизмов (2). Нормальное формирование адаптивных возможностей организма во многом обеспечивается на начальном этапе индивидуального развития (3). Оптимальные функциональные способности кровяных пластинок способствуют наилучшей текучести крови и притоку ее достаточного объема к тканям, что создает условия для правильного развертывания генетической программы животного и максимально возможного ее проявления в фенотипе (4).

Обследование новорожденных телят показало, что их тромбоциты высокочувствительны и способны повышать активность при неблагоприятных условиях (5, 6). В фазу молочного питания продолжается адаптация теленка к внеутробному существованию и идет подготовка к началу питания растительными кормами. Несмотря на значимость этой фазы в развитии животных, агрегационные способности тромбоцитов у телят-молочников остаются недостаточно исследованными. Так, не проводилась оценка внутрисосудистой активности тромбоцитов (ВАТ), во многом определяющей общую реологию крови, не изучалась интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тромбоцитах и функциональная способность их антиокислительных ферментов — регуляторов ВАТ.

Целью настоящего исследования была оценка возрастной динамики гемостатической активности тромбоцитов у здоровых телят в фазу молочного питания.

**Методика.** Опыты проводили в зимне-весенний период в телятнике Калужского филиала ПСХ «Щелканово» на 32 телятах черно-пестрой породы в фазу молочного питания. Кровь у животных брали из яремной вены в утренние часы на 11-е, 15-е, 20-е, 25-е и 30-е сут жизни. В отмытых и ресуспендированных тромбоцитах (7) определяли количество малонового диальдегида (МДА) в реакции восстановления тиобарбитуровой кислотой (8) и содержание ацилгидроперекисей (АГП) (9). Активность

внутритромбоцитарных антиоксидантных ферментов устанавливали для каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) (10). В тромбоцитах регистрировали содержание аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ) и их секрецию под влиянием коллагена. Оценивали белковый состав цитоскелета кровяных пластинок (актин и миозин) в условиях активации и агрегации тромбоцитов с АДФ и тромбином (11). Число тромбоцитов в крови подсчитывали в камере Горяева. Определяли содержание продуктов лабильзации фосфолипидов в тромбоцитарных мембранах ( $\Phi_3$ -тромбоцитов) с вычислением индекса тромбоцитарной активности (ИТА) (12). Агрегацию тромбоцитов (АТ) наблюдали визуально (13) в микротесте с применением индукторов: АДФ ( $0,5 \times 10^{-4}$  М), коллагена (разведение основной суспензии — 1:2), тромбина (0,125 ед/мл), ристомидина (0,8 мг/мл) (НПО «Ренам», Россия), адреналина ( $5 \times 10^{-6}$  М, «Gedeon Richter Ltd.», Венгрия) и их сочетаний (АДФ и адреналин, АДФ и коллаген, адреналин и коллаген). Состояние ВАТ оценивали визуально с применением фазово-контрастного микроскопа (14).

Телята находились под постоянным наблюдением. На протяжении всей фазы молочного питания перед каждым отбором биологического материала для исследования гемостатической активности тромбоцитов у них регистрировали основные физиологические показатели и проводили морфологический и биохимический анализ крови.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

*Результаты.* Морфологические и биохимические показатели крови у телят в течение эксперимента оставались в пределах физиологической нормы.

Содержание АГП в кровяных пластинках у животных 11-суточного возраста достигло  $2,87 \pm 0,10 D_{233}/10^9$  тромбоцитов, достоверно не изменяясь на протяжении всей фазы молочного питания, и на 30-е сут жизни равнялось  $2,78 \pm 0,12 D_{233}/10^9$  тромбоцитов. Количество МДА (конечный продукт ПОЛ) в тромбоцитах на 11-е сут составило  $0,90 \pm 0,06$  нмоль/ $10^9$  тромбоцитов, на 30-е сут —  $0,84 \pm 0,15$  нмоль/ $10^9$  тромбоцитов. Активность каталазы и СОД характеризовалась величиной соответственно  $9742,50 \pm 9,21$  и  $1693,30 \pm 2,46$  МЕ/ $10^9$  тромбоцитов (в среднем за фазу молочного питания).

Содержание АТФ и АДФ в тромбоцитах у здоровых телят было невысоким в течение всего периода наблюдения — соответственно  $5,55 \pm 0,09$  и  $3,42 \pm 0,06$  мкмоль/ $10^9$  тромбоцитов. Секреция АТФ и АДФ из тромбоцитов с 11-х по 30-е сут жизни также оставалась стабильной — в среднем  $32,30 \pm 0,07$  и  $43,40 \pm 0,08$  %.

Количество актина в интактных тромбоцитах у здоровых 11-суточных телят составляло  $30,20 \pm 0,12$  % от общего содержания белка в клетке и достоверно не менялось до 30-х сут жизни ( $32,20 \pm 0,19$  %). Интенсивность дополнительного образования актина на фоне активации сильным или слабым индуктором и в процессе последующей агрегации не менялась в течение всего срока наблюдения.

Аналогичную динамику функциональной активности в тромбоцитах у здоровых телят отмечали и для миозинового механизма. В интактных кровяных пластинках животных на 11-е сут жизни доля миозина составила  $13,60 \pm 0,10$  % от общего содержания белка в тромбоците и недостоверно колебалась в течение фазы молочного питания (на 30-е сут —  $14,60 \pm 0,10$  %). При активации тромбоцитов сильным или слабым индукторами и последующей агрегации в них сохранялась невысокая интенсивность образования миозина в течение всей фазы молочного питания (табл. 1).

**1. Содержание актина и миозина в тромбоцитах у телят черно-пестрой породы в фазу молочного питания ( $M \pm m$ ,  $n = 32$ , Калужский филиал ПСХ «Щелканово», зимне-весенний период)**

Состояние тромбоцитов	Возраст, сут				
	11	15	20	25	30
Актин, % к общему содержанию белка					
Интактные	30,20±0,12	30,50±0,09	30,90±0,04	31,50±0,05	32,20±0,19
На фоне АДФ-активации	32,80±0,07	33,40±0,08	33,70±0,04	33,90±0,08	34,40±0,10
На фоне АДФ-агрегации	39,80±0,12	40,00±0,14	40,30±0,12	40,50±0,07	40,90±0,12
На фоне тромбин-активации	35,30±0,13	35,50±0,05	35,70±0,06	35,90±0,15	36,30±0,12
На фоне тромбин-агрегации	38,80±0,16	38,90±0,12	39,20±0,07	39,40±0,04	39,70±0,09
Миозин, % к общему содержанию белка					
Интактные	13,60±0,10	13,80±0,14	13,90±0,12	14,20±0,11	14,60±0,10
На фоне АДФ-активации	20,60±0,08	21,00±0,12	21,20±0,14	21,40±0,08	21,80±0,12
На фоне АДФ-агрегации	28,90±0,10	29,10±0,09	29,40±0,08	29,60±0,12	29,90±0,09
На фоне тромбин-активации	33,60±0,06	33,80±0,15	34,10±0,07	34,30±0,03	34,50±0,16
На фоне тромбин-агрегации	42,40±0,11	42,60±0,10	42,70±0,09	42,80±0,12	42,90±0,07

Примечание. Достоверных различий между показателями в исследованные возрастные периоды не обнаружено.

Величина ИТА в начале фазы молочного питания равнялась  $25,90 \pm 0,06$  %, на 30-е сут жизни —  $26,60 \pm 0,07$  %, что указывает на постоянную лабильность тромбоцитарных фосфолипидов, которые служат стимуляторами свертывания крови.

**2. Агрегационная способность тромбоцитов у телят черно-пестрой породы в фазу молочного питания *in vitro* и *in vivo* ( $M \pm m$ ,  $n = 32$ , Калужский филиал ПСХ «Щелканово», зимне-весенний период)**

Показатель	Возраст, сут				
	11	15	20	25	30
Агрегация <i>in vitro</i>					
Время АТ в присутствии индукторов, с:					
АДФ	39,70±0,12	39,50±0,09	39,30±0,03	39,00±0,04	38,70±0,07
коллаген	30,30±0,10	29,90±0,06	29,70±0,02	29,20±0,05	28,60±0,03
тромбин	54,00±0,12	53,70±0,08	53,50±0,05	53,00±0,06	52,60±0,04
ристомин	47,80±0,09	47,50±0,16	47,20±0,13	46,90±0,08	46,50±0,05
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	41,30±0,05	41,00±0,08	40,70±0,03	40,40±0,06	39,70±0,02
адреналин	97,80±0,05	97,60±0,11	97,20±0,08	96,50±0,06	96,10±0,04
АДФ + адреналин	37,00±0,03	36,80±0,07	36,40±0,10	36,10±0,02	35,80±0,05
АДФ + коллаген	27,50±0,06	27,20±0,02	26,90±0,04	26,60±0,06	26,30±0,09
адреналин + коллаген	30,70±0,04	30,40±0,03	30,10±0,11	29,80±0,10	29,60±0,08
Агрегация <i>in vivo</i>					
Дискоциты, %	79,00±0,06	78,60±0,03	78,20±0,08	77,70±0,03	77,40±0,10
Дискоэритроциты, %	12,70±0,07	12,80±0,02	12,60±0,04	13,10±0,04	13,40±0,05
Сфероциты, %	4,30±0,02	4,30±0,01	4,40±0,05	4,50±0,03	4,50±0,06
Сфероэритроциты, %	3,20±0,03	3,10±0,08	3,30±0,06	3,30±0,04	3,40±0,02
Биполярные формы, %	0,80±0,02	1,20±0,03	1,50±0,01	1,40±0,03	1,30±0,02
Сумма активных форм, %	21,00±0,06	21,40±0,10	21,80±0,07	22,30±0,12	22,60±0,08
Доля тромбоцитов в агрегатах, %	5,30±0,08	5,40±0,04	5,50±0,02	5,50±0,07	5,60±0,08
Число малых агрегатов (по 2-3 тромбоцита на 100 свободно лежащих)	3,80±0,02	3,80±0,03	4,00±0,06	4,10±0,02	4,10±0,05
Число средних и больших агрегатов (по 4 тромбоцита и более на 100 свободно лежащих)	0,13±0,02	0,14±0,03	0,15±0,06	0,15±0,02	0,16±0,03

Примечание. АТ — агрегация тромбоцитов. Достоверных различий между показателями в исследованные возрастные периоды не обнаружено.

У 11-суточных животных время развития АТ со всеми испытанными индукторами удлинялось (табл. 2). Так, под влиянием коллагена показатель АТ составлял  $30,30 \pm 0,10$  с и оставался достаточно низким в течение фазы молочного питания. Под действием АДФ и ристомина достоверная динамика АТ отсутствовала. Проявление тромбиновой и адреналиновой АТ было замедлено, а ее длительность достоверно не изменялась. При применении двух индукторов (АДФ + адреналин, АДФ + коллаген, адреналин + коллаген) наблюдалась аналогичная ситуация.

Количество дискоцитов в крови у телят на 11-е сут жизни составляло  $79,00 \pm 0,06$ , на 30-е —  $77,40 \pm 0,10$  %. Содержание всех активных форм

тромбоцитов: дискоэритроцитов, сфероцитов, сфероэритроцитов и биполярных разновидностей тромбоцитов имело слабую тенденцию к повышению на протяжении фазы молочного питания. Суммарная величина всех активных форм тромбоцитов также не претерпевала достоверных изменений. Число свободно циркулирующих малых и больших агрегатов тромбоцитов в начале наблюдения составляло  $3,80 \pm 0,02$  и  $0,13 \pm 0,02$ , к его завершению —  $4,10 \pm 0,05$  и  $0,16 \pm 0,03$  (на 100 свободно лежащих). Степень вовлеченности тромбоцитов в агрегаты к началу фазы молочного питания равнялась  $5,30 \pm 0,08$ , к концу —  $5,60 \pm 0,08$  %.

Оптимальное состояние организма во многом определяется необходимым притоком питательных веществ и кислорода к тканям, который, в свою очередь, зависит от реологических свойств клеток крови, изменяющихся в процессе онтогенеза. Важную роль в текучести крови играет активность тромбоцитов (1).

Мы выяснили, что для здоровых телят в фазу молочного питания характерна высокая антиоксидантная активность тромбоцитов, эффективно сдерживающая ПОЛ. Невыраженная интенсивность свободнорадикальных процессов у телят-молочников во многом обеспечивала стабильность прочих функциональных показателей кровяных пластинок с 11-х по 30-е сут жизни, в том числе состояние самосборки актино-миозинового комплекса, содержание и секрецию АДФ и АТФ.

Для телят в фазу молочного питания была свойственна невысокая АТ, которая достоверно не изменялась с возрастом животных. Вероятно, это связано со значительной устойчивостью тромбоцитов к экзогенным влияниям при стабильной концентрации в крови фактора Виллебранда (ФВ) — кофактора адгезии тромбоцитов и неизменном количестве рецепторов к нему (GPIb) на поверхности кровяных пластинок у телят в возрасте 11-30 сут. Низкая активность рецепторов, по-видимому, во многом обусловлена сложными приспособительными реакциями в организме животных и антиоксидантной защитой мембран кровяных пластинок. Наблюдаемое в течение фазы молочного питания постоянство показателей АТ при действии сильных индукторов агрегации — коллагена и тромбина определялось невысокой активностью фосфолипазы С, обеспечивающей фосфоинозитольный путь стимуляции тромбоцитов через диацилглицерол и протеинкиназу С с невыраженной самосборкой в кровяных пластинках актина и миозина. Слабые индукторы агрегации — АДФ и адреналин также вызывали стабильную АТ, что указывало на невысокую доступность рецепторов или небольшое их число на мембранах кровяных пластинок при неактивной экспрессии фибриногеновых рецепторов (GPIIb-IIIa) и невыраженной активации фосфолипазы А<sub>2</sub>, регулирующей высвобождение арахидоновой кислоты из мембран для образования тромбоксана А<sub>2</sub>. Одновременное использование двух индукторов оказывало взаимоусиливающее влияние на тромбоциты при неизменной длительности АТ. По-видимому, в основе регистрируемой активности АТ с различными индукторами и их сочетаниями лежал определенный уровень активности ферментных систем тромбоцитов, обуславливающих оптимальную реакцию кровяных пластинок на воздействие извне.

Стабильно невысокая ВАТ в течение фазы молочного питания свидетельствовала о низкой экспрессии на мембранах тромбоцитов рецепторов, взаимодействующих с постоянно присутствующими в кровотоке индукторами агрегации (тромбин, АДФ, адреналин), и невысокой активности внутритромбоцитарных механизмов, реализующих их воздействие на кровяные пластинки.

Таким образом, для телят в фазу молочного питания характерна стабильно высокая антиоксидантная активность тромбоцитов, эффективно

сдерживающая в них перекисное окисление липидов. Невысокая активность тромбоцитов при физиологическом содержании в кровотоке их активированных разновидностей и агрегатов всех размеров имеет важное адаптивное значение в условиях растущего влияния окружающей среды на организм животного.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Медведев И.Н. Динамика тромбоцитарной активности в раннем онтогенезе поросят. Зоотехния, 2008, 9: 27-28.
2. Шевченко Т.С., Коноплева И.В. Активность аденилатциклазы в лимфоцитах и тромбоцитах крупного рогатого скота при действии внешнего  $\gamma$ -излучения. Сельскохозяйственная биология, 2011, 2: 63-67.
3. Галочкина В.П., Галочкин В.А. Физиолого-биохимическая характеристика метаболического типа жвачных животных. Сельскохозяйственная биология, 2010, 6: 9-15.
4. Завалишина С.Ю. Функциональное состояние системы гемостаза у новорожденных телят. Ветеринария, 2011, 6: 42-45.
5. Медведев И.Н., Завалишина С.Ю. Активность тромбоцитарного гемостаза у здоровых новорожденных телят. Доклады РАСХН, 2011, 5: 32-34.
6. Завалишина С.Ю. Тромбоцитарная активность у новорожденных телят при железодефицитной анемии. Ветеринария, 2012, 2: 51-52.
7. Ястребов Г.Н. Метод выделения тромбоцитов для изучения их липидного состава. Лабораторное дело, 1985, 2: 93-95.
8. Кубатиев А.А., Андреев С.В. Перекиси липидов и тромбоз. Бюлл. экспериментальной биологии и медицины, 1979, 5: 414-417.
9. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови. Лабораторное дело, 1983, 3: 33-36.
10. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лабораторное дело, 1991, 10: 9-13.
11. Ермолаева Т.А., Головина О.Г., Морозова Т.В. Программа клинико-лабораторного обследования больных тромбоцитопатиями. СПб, 1992.
12. Баркаган З.С., Еремин Г.Ф., Давыдов А.В. Обоснование и клиническая оценка некоторых новых методических приемов распознавания предтромботических состояний и латентных тромбозов. Мат. VII пленума Всерос. науч. мед. общества терапевтов и Всерос. науч. мед. общества врачей-лаборантов «Лабораторные методы исследования в современной клинике внутренних болезней». М., 1974: 36-38.
13. Шитикова А.С. Визуальный микрометод исследования агрегации тромбоцитов. В кн.: Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний /Под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаян. СПб, 1999: 49-53.
14. Шитикова А.С., Тарковская Л.Р., Каргин В.Д. Метод определения внутрисудистой активации тромбоцитов и его значение в клинической практике. Клиническая и лабораторная диагностика, 1997, 2: 23-35.

Курский институт социального образования (филиал)  
ФГБОУ ВПО Российского государственного  
социального университета,  
305029 г. Курск, ул. К. Маркса, 51,  
e-mail: ilmedv1@yandex.ru

Поступила в редакцию  
21 июня 2012 года

## HEMOSTATIC ACTIVITY OF THROMBOCYTES IN CALVES DURING THE PHASE OF MILK FEEDING

*S. Yu. Zavalishina*

### S u m m a r y

The adaptability of adult animals greatly depends on the early ontogenesis. Thrombocytes promote the best blood flow and an adequate blood supply in tissues and organs. The age dynamics of hemostatic activity of blood platelets was investigated in healthy Black-and-White calves at the phase of milk feeding. In the 11, 15, 20, 25 and 30 days old animals, the author detected the stable intensity of lipid peroxidation, the stable functioning of actin-myosin mechanism and antioxidant protection of thrombocytes, the stable content of adenosine phosphates and their pronounced secretion during activation and aggregation. The low functional activity of thrombocytes was registered both in vitro and in vivo. Apparently it depends on a constant activity of receptor and postreceptor mechanisms, determining a functional activity of thrombocytes under the growing influence of the environment in early animal ontogenesis.