

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРОМБОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ ХОЛМОГОРСКОЙ ПОРОДЫ

И.Н. Медведев¹, доктор биологических наук, Н.В. Воробьева², кандидат биологических наук

¹Российский государственный социальный университет,
129226, Москва, ул. В. Пика, 4

²Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных –
филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста,
249013, Калужская область, Боровск, поселок Институт
E-mail: ilmedv1@yandex.ru

Оценена активность тромбоцитов у новорожденных телят холмогорской породы. Исследования проведены на 39 животных, полученных от здоровых коров 2-3 отела. Телят за время наблюдения обследовали пятикратно через двое суток. На протяжении фазы новорожденности выявлена тенденция к повышению активности процесса агрегации кровяных пластинок со всеми испытанными индукторами. Отмечено, что число дискоидных тромбоцитов в крови телят за период наблюдения имело тенденцию к уменьшению. При этом уровень активированных тромбоцитов суммарно возрос на 12,9% и повышалось содержание свободно циркулирующих агрегатов мелких, средних и крупных размеров. Данные изменения обеспечивались у телят небольшим усилением синтеза тромбоксана в кровяных пластинках, что происходило за счет повышения активности тромбоцитарных циклооксигеназы и тромбоксансинтазы. Кроме того, большую значимость в увеличении тромбоцитарной активности имело повышение количественного содержания в гранулах тромбоцитов аденозинфосфатов и некоторое усиление их секреции. Уровень актина и миозина в дискоидных тромбоцитах телят за фазу новорожденности повысился на 6,4% и 12,6%, соответственно. Это сопровождалось тенденцией к росту количества актина и миозина в тромбоцитах в процессе их агрегации в ответ на слабый и на сильный индуктор на 6,4% и 10,1%, соответственно. Для телят холмогорской породы в период новорожденности характерно небольшое усиление активности гемостатических свойств тромбоцитов, что нивелирует у них риск кровотечения при оптимальных условиях для микроциркуляции. Увеличивающаяся внутрисосудистая тромбоцитарная активность формирует у животных в фазу новорожденности условия для оптимальных анаболических процессов в тканях.

PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF PLATELETS IN NEWBORN CALVES OF THE Kholmogory BREED

Medvedev I.N.¹, Vorobyeva N.V.²

¹Russian State Social University,
129226, Moscow, ul. V. Pika, 4

²All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition –
Branch of the Federal Scientific Research Center for Livestock –
All-Russian Institute of Livestock named after Academician L.K. Ernst,
249013, Kaluzhskaya oblast, Borovsk, poselok Institute
E-mail: ilmedv1@yandex.ru

The platelet activity in newborn calves of the Kholmogory breed was evaluated. Studies were conducted on 39 animals obtained from healthy cows 2-3 calving. Calves were examined five times in two days during the observation period. During the neonatal phase, a tendency toward an increase in the activity of the process of aggregation of blood plates with all tested inducers was revealed. It was noted that the number of discoid platelets in the blood of calves during the observation period tended to decrease. At the same time, the level of activated platelets increased by 12.9% in total, and the content of freely circulating aggregates of small, medium and large sizes also increased. These changes were provided in calves with a slight increase in the synthesis of thromboxane in their blood plates. This was due to increased activity of platelet cyclooxygenase and thromboxane synthetase. In addition, an increase in the quantitative content of adenosine phosphates in the platelet granules and some increase in their secretion were of great importance in increasing platelet activity. The level of actin and myosin in calf discoid platelets during the neonatal phase increased by 6.4% and 12.6%, respectively. This was accompanied by a tendency to increase the number of actin and myosin in platelets during their aggregation in response to a weak and a strong inducer by 6.4% and 10.1%, respectively. Calves of the Kholmogory breed during the neonatal phase are characterized by a slight increase in the activity of the hemostatic properties of platelets. This eliminates their risk of bleeding under optimal conditions for microcirculation. The increasing intravascular platelet activity forms conditions for optimal anabolic processes in tissues in animals during the neonatal period.

Ключевые слова: телята, новорожденность, холмогорская порода, тромбоциты, агрегация, секреция

Key words: calves, newborn, Kholmogory breed, platelets, aggregation, secretion

Процессы, протекающие в крови, существенно влияют на ход гемоциркуляции [1]. Большую значимость в этом имеют показатели форменных элементов крови, в том числе тромбоцитов, чьи гемостатические свойства в значительной мере определяют процессы микроциркуляции у всех млекопитающих [2]. Ранее выяснено, что уровень функциональной активности тромбоцитов

способен изменяться на фоне процессов роста организма [3], в ходе его созревания [4], в случае появления различных дисфункций [5], прогрессивной патологии и на фоне проведения лечебных процедур [6]. Однако многие вопросы функционирования тромбоцитов у разных пород крупного рогатого скота остаются выяснены весьма слабо. Имеются лишь отдельные исследования,

посвященные активности тромбоцитов у этого вида продуктивных животных, в которых учитывались их генетические особенности [7], однако они не позволяют создать целостного представления по данному вопросу.

Потребность в дальнейших исследованиях связана с высокой биологической ролью тромбоцитов для капиллярной гемокоагуляции. Процессы микроциркуляции в большей степени определяют рост и развитие у телят костно-мышечной системы и их внутренних органов, а, следовательно, их продуктивный потенциал [8]. Ввиду важности выяснения влияния генетических особенностей на активность тромбоцитов у отдельных пород крупного рогатого скота представлялось важным определить функциональные свойства тромбоцитов у телят высокопродуктивной молочной холмогорской породы в первой фазе их раннего онтогенеза.

Цель исследований – оценить состояние активности тромбоцитов у новорожденных телят холмогорской породы.

Методика. Исследования проведены в строгом соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (принята в Страсбурге 18 марта 1986 г. и подтверждена в Страсбурге 15 июня 2006 г.).

Работа выполнена на 39 чистокровных телятах холмогорской породы, полученных от здоровых коров 2-3 отела. Все телята обследованы в течение фазы новорожденности 5 раз: на 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 и 9-10 сутки их жизни.

Опосредованная оценка уровня генерации в тромбоцитах тромбосана и активности участвующих в данном процессе ферментов циклооксигеназы и тромбосансинтетазы осуществлялась с помощью трех проб переноса при помощи фотоэлектроколориметра [9]. В кровяных пластинках животных оценивали уровень аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ), выраженность процесса их секреции в ответ на внесение в плазму коллагена, а также количество актина и миозина в составе белкового каркаса неактивных и подвергнутых АДФ-агрегации тромбоцитов [9].

Время развития агрегации тромбоцитов (АТ) выясняли при помощи визуального микрометода [10], применив АДФ ($0,5 \times 10^{-4}$ М), тромбин (0,125 ед/мл), коллаген (разведение 1:2 основной суспензии), адреналин ($5,0 \times 10^{-6}$ М) и ристомицин (0,8 мг/мл) в плазме, богатой тромбоцитами, которую предварительно стандартизировали по уровню тромбоцитов до значения 200×10^9 тромбоцитов в одном литре. Состояние внутрисосудистой активности тромбоцитов оценивали на фазово-контрастном микроскопе [10].

Статистическая обработка полученных цифровых данных производилась с помощью программного пакета «Статистика» для Windows 6.0, Microsoft Excel. Различия в данных считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. У телят холмогорской породы в период новорожденности выявлена тенденция к росту гемостатической активности тромбоцитов. У обследованного молодняка при первом наблюдении АТ развивалась в ответ на внесение коллагена за $32,4 \pm 0,12$ с, постепенно ускоряясь к концу фазы до $30,8 \pm 0,19$ с. Сходное ускорения АТ отменено в ответ на применение АДФ и ристомицина (до $37,0 \pm 0,15$ с и $47,1 \pm 0,16$ с, соответственно). Также отмечена тенденция к сокращению времени возникновения АТ в ответ на тромбин и адреналин до $49,3 \pm 0,17$ и $93,4 \pm 0,15$ с (табл.).

Количество дискоидных тромбоцитов в крови телят холмогорской породы в период новорожденности уменьшилось, количество активных тромбоцитов возросло на 12,9%. При этом количество циркулирующих в крови агрегатов тромбоцитов всех размеров также увеличилось.

Функционально значимым механизмом обеспечения тенденции к сокращению времени АТ у новорожденных телят холмогорской породы следует рассматривать выявленное усиление синтеза в их тромбоцитах тромбосана. На это косвенно указывала интенсификация АТ в проведенной простой пробе переноса. Величина этого показателя составила на 9-10 сутки онтогенеза животных $34,0 \pm 0,22\%$. Выявленная динамика у обследованных телят обеспечивалась тенденцией к активации в их тромбоцитах функциональных возможностей циклооксигеназы и тромбосансинтетазы. Об этом свидетельствовало нарастание степени восстановления АТ в ходе коллаген-аспириновой пробы, позволившей опосредованно оценивать изменение активности тромбоцитарной циклооксигеназы (на момент окончания наблюдения $83,8 \pm 0,14\%$). Степень восстановления АТ в ходе коллаген-имидазольной пробы, позволяющей опосредованно оценивать динамику активности тромбоцитарной тромбосансинтетазы, у наблюдаемых телят также возрастала, достигая на 9-10 сутки $44,3 \pm 0,10\%$.

Изначально невысокое содержание в тромбоцитах телят АТФ и АДФ в последующем испытывало тенденцию к росту и достигало к 9-10 суткам их жизни уровней $5,69 \pm 0,017$ и $3,47 \pm 0,010$ мкмоль/ 10^9 тромбоцитов. При этом интенсивность их секреторного выброса за первые 10 суток повысилась до $35,1 \pm 0,13\%$ и $45,3 \pm 0,22\%$, соответственно.

Количество актина и миозина при первом обследовании в интактных кровяных пластинках телят составляло $31,2 \pm 0,14\%$ и $14,3 \pm 0,19\%$ к общему белку. В конце наблюдений оно несколько увеличилось и достигало $33,2 \pm 0,12\%$ и $16,7 \pm 0,09\%$ к общему белку в тромбоцитах. У телят отмечена склонность к нарастанию генерации актина и миозина в кровяных пластинках в случае их агрегации.

Оптимальная длительность АТ при внесении в плазму коллагена и ристомицина говорила о небольшой выраженности адгезии тромбоцитов у телят на протяжении новорожденности. Выявленная тенденция к ее усилению, видимо, имела в своей основе как минимум два процесса [11]. На существование первого механизма указывала найденная склонность к ускорению тромбоцитарной агрегации под влиянием коллагена [12]. Это следует связывать с повышением на мембранах тромбоцитов телят в течение первой фазы раннего онтогенеза плотности гликопротеидов Ia-IIa и VI, выполняющих функции рецепторов, способных соединяться с коллагеном [13]. Вторым механизмом интенсификации адгезии тромбоцитов следует считать рост на их поверхности количества рецепторов, способных взаимодействовать с фактором Виллебранда (GPIIb), концентрация которого, видимо, также нарастает в крови за первые 10 суток жизни телят. Это доказывалось зарегистрированным у обследованных животных сокращением времени АТ в ответ на ристомицин [14].

Выявленная у новорожденных телят холмогорской породы склонность к ускорению агрегации тромбоцитов формировала в достаточной степени защиту их организма от развития кровопотери. Некоторое ускоре-

Тромбоцитарные характеристики у новорожденных телят холмогорской породы

Показатель	Возраст, сутки				
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10
Содержание АТФ в тромбоцитах до начала секреции, мкмоль/10 ⁹ тромбоцитов	5,54±0,012	5,58±0,016	5,60±0,018	5,63±0,020	5,69±0,017
Содержание АДФ в тромбоцитах до начала секреции, мкмоль/10 ⁹ тромбоцитов	3,31±0,006	3,35±0,008	3,41±0,004	3,42±0,007	3,47±0,010
Уровень секреции АТФ, %	32,5±0,12	33,8±0,20	34,2±0,06	34,6±0,05	35,1±0,13
Уровень секреции АДФ, %	43,6±0,14	43,9±0,18	44,2±0,12	44,5±0,20	45,3±0,22
Степень восстановления АТ при проведении коллаген-аспириновой пробы, %	82,1±0,06	82,4±0,08	82,8±0,07	83,2±0,09	83,8±0,14
Степень восстановления АТ при проведении коллаген-имидазольной пробы, %	42,3±0,03	42,6±0,07	42,9±0,04	43,4±0,08	44,3±0,10
Активность АТ в простой пробе переноса, %	31,7±0,08	31,9±0,14	32,7±0,05	33,3±0,09	34,0±0,22*
Время наступления АТ с АДФ, с	38,6±0,14	38,4±0,17	38,0±0,21	37,5±0,18	37,0±0,15
Время наступления АТ с коллагеном, с	32,4±0,12	32,1±0,16	31,8±0,18	31,4±0,14	30,8±0,19
Время наступления АТ с тромбином, с	50,8±0,21	50,2±0,13	49,8±0,15	49,6±0,12	49,3±0,17
Время наступления АТ с ристомицином, с	48,4±0,19	48,2±0,18	47,9±0,12	47,4±0,18	47,1±0,16
Время наступления АТ с адреналином, с	95,8±0,20	95,2±0,17	94,6±0,17	94,0±0,16	93,4±0,15
Количество тромбоцитов-дискоцитов, %	76,8±0,18	76,5±0,12	76,2±0,16	75,4±0,12	73,8±0,18
Сумма активных форм тромбоцитов, %	23,2±0,17	23,5±0,20	23,8±0,19	24,6±0,15	26,2±0,18*
Количество малых тромбоцитарных агрегатов, на 100 свободных тромбоцитов	3,5±0,05	3,7±0,07	3,9±0,06*	4,1±0,08**	4,2±0,09**
Количество средних и больших тромбоцитарных агрегатов, на 100 свободных тромбоцитов	0,12±0,023	0,13±0,014	0,13±0,016	0,14±0,017*	0,16±0,022**

* p<0,05; **p<0,01 по сравнению 1-2-х суточным возрастом.

ние АТ в ответ на сильные агрегационные индукторы (коллаген и тромбин), очевидно, связано не только с повышением числа рецепторов к ним на тромбоцитах, но и с некоторой активацией фосфолипазы С, стимуляцией процессов фосфоинозитольного пути и усилением фосфолирирования белков, составляющих тромбоцитарную сократительную систему [15]. Наклонность к росту генерации инозитолтрифосфата в кровяных пластинках телят холмогорской породы развивалась, видимо, в результате некоторого роста выхода из тромбоцитарных депо Ca²⁺, что усиливало в них самосборку актомиозина и процесс его сокращения [2].

В ходе воздействия слабых индукторов агрегации (АДФ и адреналина) на тромбоциты телят холмогорской породы также продемонстрирована склонность к усилению реализации агрегационных процессов. В основе этого, очевидно, лежало повышением плотности расположения рецепторов к ним и фибриногену GPIIb-IIIa на поверхности мембран тромбоцитов, а также некоторое повышение уровня активности в них фермента фосфолипазы A₂. Данный механизм обеспечивал поступление из мембранных липидов в цитоплазму достаточного количества свободной арахидоновой кислоты, создавая условия для оптимальной генерации

тромбоксана A₂. Оптимум этого процесса у телят холмогорской породы обеспечивался тенденцией к усилению активности обоих ферментов, реализующих этот процесс, – циклооксигеназы и тромбоксансинтетазы. Об этом свидетельствовало усиление АТ в примененных в работе пробах переноса – коллагенаспириновой и коллагенимидозальной. Еще одним важным механизмом усиления развития АТ у телят в период новорожденности является найденная склонность к усилению самосборки в тромбоцитах молекул актина и миозина, появление в плазме индуктора агрегации и рост полноты секреции из плотных гранул тромбоцитов молекул АТФ и АДФ [10].

Некоторое усиление тромбоцитарной активности у животных в течение первых 10 суток жизни доказывалось также выявленным увеличением уровня активных форм тромбоцитов в их крови. Это говорит о повышении чувствительности тромбоцитарных рецепторов в условиях *in vivo* к различным индукторам агрегации. Выявленный рост интраваскулярной активности тромбоцитов также свидетельствовал о некотором нарастании уровня доступности для тромбоцитов коллагена среднего слоя сосудистой стенки. По всей видимости, этому способствовали механические воздействия на

сосуды, увеличивающие количество свободноперемещающихся агрегатов кровяных пластинок. Вероятно, в крови телят холмогорской породы в течение фазы новорожденности имеет место некоторое увеличение концентраций растворимых индукторов агрегации (АДФ, адреналина, тромбина) [12].

Таким образом, у новорожденных телят холмогорской породы отмечается функциональная достаточность гемостатических свойств тромбоцитов. Их уровень формирует необходимые для жизнеобеспечения условия нормального кровообращения в капиллярах в течение первой фазы раннего онтогенеза. В основе этого у телят холмогорской породы лежит невысокая активность биохимических процессов, реализующих тромбоцитарные адгезию, агрегацию и секрецию. Небольшая интраваскулярная активация тромбоцитов в течение периода новорожденности обеспечивает сохранение у телят холмогорской породы оптимума кровотока в мелких сосудах мышц и всех внутренних органов.

Литература

1. Ошуркова Ю.Л., Глаголева Т.И. Биологические аспекты интенсификации животноводства // *Российская сельскохозяйственная наука*. – 2017. – №5. – С. 51-53.
2. Завалишина С.Ю. Противосвертывающая и фибринолитическая активность плазмы крови у телят // *Ветеринария*. – 2010. – №11. – С. 41-43.
3. Glagoleva T.I., Zavalishina S.Y. Aggregative Activity of Basic Regular Blood Elements and Vascular Disaggregating Control over It in Calves of Milk-vegetable Nutrition // *Annual Research & Review in Biology*. – 2017. – T.12. – №6. – P.1-7.
4. Skoryatina I.A., Zavalishina S.Y. A Study of the Early Disturbances in Vascular Hemostasis in Experimentally Induced Metabolic Syndrome // *Annual Research & Review in Biology*. – 2017. – T.15. – № 6. – P. 1-9
5. Vatikov Yu.A., Zavalishina S.Yu., Seleznev S.B., Kulikov E.V., Notina E.A., Rystsova E.O., Petrov A.K., Kochneva M.V., Glagoleva T.I. Orderly muscle activity in elimination of erythrocytes microrheological abnormalities in rats with experimentally developed obesity // *Bali Medical Journal*. – 2018. – T.7. – №3. – С. 698-705.
6. Чинаров В.И. Оценка конкурентоспособности молочных пород крупного рогатого скота. // *Достижения науки и техники АПК*. – 2018. – Т.32. – №10. – С.74-78.
7. Tkacheva E.S., Zavalishina S.Yu. Functional Features of Platelet Secretion in Piglets During Early Ontogenesis // *Biomedical & Pharmacology Journal*. – 2019. – Vol. 12(1). – P.485-489.
8. Фирсова Э.В., Митюков А.С. Сохранение холмогорской породы крупного рогатого скота // *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*. – 2017. – № 4(49). – С.77-82.
9. Ермолаева Т.А., Головина О.Г., Морозова Т.В. Программа клинико-лабораторного обследования больных тромбоцитопатиями. – СПб., 1992. – 25 с.
10. Шитикова А.С. Тромбоцитарный гемостаз. – СПб.: Изд-во СПб. ГМУ, 2000. – 227 с.
11. Глаголева Т.И. Физиологические особенности спонтанной агрегации эритроцитов у телят молозивного питания // *Международный вестник ветеринарии*. – 2016. – №4. – С.80-83.
12. Завалишина С.Ю. Сосудистый гемостаз у телят в период молочно-растительного питания // *Зоотехния*. – 2012. – № 2. – С. 21.
13. Tkacheva E.S. Physiological features of platelets in milk and vegetable nutrition piglets // *Biomedical and Pharmacology Journal*. – 2018. – T.11. – № 3. – С.1437-1442.
14. Завалишина С.Ю., Глаголева Т.И. Контроль сосудистой стенки над индуцированной агрегацией тромбоцитов у новорожденных телят в условиях дефицита железа // *Ветеринарная практика*. – 2013. – №2. – С.40.
15. Zavalishina S.Y. Restoration of Physiological Activity of Platelets in New-Born Calves With Iron Deficiency // *Biomedical and Pharmacology Journal*. – 2017. – T.10. – №2. – С. 711-716.

Поступила в редакцию 01.04.19
После доработки 12.05.19
Принята к публикации 19.06.19