

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ
им. А. Н. БАКУЛЕВА РАМН

НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО «КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЯ»



**ЧЕТВЕРТАЯ
ВСЕРОССИЙСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ**

***«КЛИНИЧЕСКАЯ ГЕМОСТАЗИОЛОГИЯ
И ГЕМОРЕОЛОГИЯ
В СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ХИРУРГИИ»
(с международным участием)***

МОСКВА
4–6 февраля 2009 г.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

Заказ № 605

Тираж 500 экз.

Отпечатано в НЦССХ им. А. Н. Бакулева РАМН

ПЕРЕСТРОЙКИ ХРОМАТИНА ЛИМФОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ В УСЛОВИЯХ ТЕПЛОВОГО ШОКА *IN VITRO* СВЯЗАНЫ С МОРФОЛОГИЕЙ ТРОМБОЦИТОВ

Вишневская С. М., Кручинский Н.Г.

Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова, Могилев, Беларусь

Цельная кровь часто используется в качестве модельного объекта при изучении особенностей функционирования системы гемостаза (J. D. Emery et al., 1995; M.-A. Brockmann et al., 2001; O. H. Larsen et al., 2006). При этом многие особенности комплексных реакций крови как уникальной многокомпонентной системы остаются малоизученными. В рамках наших исследований, посвященных морфофункциональным особенностям лейкоцитов крови в условиях функциональных нагрузок, мы уделяем подобным комплексным реакциям особое внимание, учитывая современные представления о связи процессов иммуногенеза и гемостаза (Кузник В.И., 1988), а также влияние антикоагулянтов на функции тромбоцитов.

Цель работы. Выяснить, существует ли связь между количеством, морфологическими особенностями тромбоцитов и микроструктурными параметрами хроматина лимфоцитов и нейтрофилов при моделировании теплового шока в цельной крови *in vitro*.

Методы. Образцы цельной крови здоровых добровольцев ($n=6$) с антикоагулянтом (гепарин, конечная концентрация 20 ед/мл) инкубировали при 42° (тепловой шок) и параллельно при 37° (контроль). Через 15, 30 и 60 мин из крови готовили мазки, а остальную кровь подвергали исследованию на гемоанализаторе (Abacus Diatron, Австрия). Мазки высушивали на воздухе, фиксировали, обрабатывали раствором РНКазы и окрашивали стехиометрическим комплексным красителем на нуклеиновые кислоты галлоцианин - хромовые квасцы. Готовые препараты исследовали под микроскопом (AxioImager Carl Zeiss $\times 1000/NA 1.3$, программа AxioVision, камера AxioCam), на их основе создавали архив цифровых изображений ядер лимфоцитов и нейтрофилов. Обработку и анализ морфологии ядер проводили с помощью программы ImageJ.

Результаты. На ранних сроках теплового шока (15 мин) в лейкоцитах наблюдаются признаки общей неспецифической активации генома: уменьшение средней оптической плотности ядер лимфоцитов от $0,315 \pm 0,02$ до $0,31 \pm 0,01$ и ядер нейтрофилов от $0,54 \pm 0,24$ до $0,47 \pm 0,14$ (медиана \pm стандартное отклонение, $p < 0,05$; здесь и далее при оценке достоверности изменений используется критерий Манна-Уитни), на изображениях ядер лимфоцитов зарегистрировано появление более

светлых участков по сравнению с исходными значениями и контролем по времени (оптическая плотность 0,21 против 0,24 и 0,23; $p < 0,05$). В дальнейшем появляются признаки стабилизации генетического материала на новом уровне функционирования. Через 30 минут инкубирования при 42° увеличивается показатель контраста в пределах хроматина лимфоцитов и нейтрофилов ($0,36 \pm 0,03$ и $0,39 \pm 0,014$ по сравнению с исходными $0,29 \pm 0,009$ и $0,37 \pm 0,015$ соответственно, $p < 0,05$), у нейтрофилов он продолжает нарастать к 60-й минуте ($0,74 \pm 0,02$). В контрольных условиях этот показатель увеличивается по сравнению с исходным в меньшей степени только у лимфоцитов к 60-й минуте ($0,33 \pm 0,03$; $p > 0,05$). Нами обнаружена значимая обратная статистическая связь между степенью контраста хроматина лимфоцитов после 60-минутного перегревания и тромбокритом крови, взятой для эксперимента (коэффициент корреляции по Спирмену составил $-0,83$; $p < 0,05$). Дальнейшие исследования выявили тенденцию к сокращению широты распределения тромбоцитов по размеру после 60-минутного теплового шока до $13,8 \pm 2,59$ фл против $14,7 \pm 4,23$ в исходных пробах ($p > 0,05$), в то время как в параллельных контрольных пробах этот параметр увеличивался до $15,06 \pm 2,59$ фл ($p > 0,05$). В 30-минутной точке широта распределения тромбоцитов значительно варьировала между пробами.

Заключение. В условиях теплового шока цельной крови *in vitro* наблюдаются признаки активации хроматина лимфоцитов и нейтрофилов. Изменения хроматина в начале эксперимента указывают на инициацию перестроек, затем распределение оптической плотности приобретает четко выраженный дифференциально-очаговый характер. При этом оптические характеристики хроматина лимфоцитов были статистически связаны с тромбокритом крови, взятой для эксперимента. Уменьшение широты распределения тромбоцитов по размеру при подвергании цельной крови тепловому шоку дает основание предположить изменение свойств их мембран в этих условиях. Подобные явления могут лежать в основе различной степени активации лимфоцитарного генома в присутствии разного количества и морфологического состава тромбоцитов. Кроме того, как было показано ранее, в результате использования гепарина в качестве лечебного препарата может наблюдаться гепарин-индуцированная тромбопения, сопровождающаяся активацией, агрегацией и разрушением тромбоцитов. В одних случаях причиной служит сам гепарин, его фиксация на мембране тромбоцитов; в основе других случаев лежит образование иммунных комплексов (Л. А. Бокерия, И. Н. Чичерин, 2007). Таким образом, выявленные нами тенденции могут быть обусловлены совокупностью причин, требующих дальнейшего детального изучения.