

© С. А. Гаспарян<sup>1</sup>, С. М. Чотчаева<sup>1</sup>,  
И. А. Василенко<sup>2</sup>, И. С. Кастрикина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра акушерства и гинекологии  
ФПО Ставропольской государственной  
медицинской академии, Ставрополь

<sup>2</sup> Лаборатория компьютерной  
цитоморфометрии ФГУ Российский  
геронтологический научно-клинический  
центр Росздрава, Москва

## СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ НЕРАЗВИВАЮЩЕЙСЯ БЕРЕМЕННОСТИ

УДК: 618.3-06:618.39

■ Методом витальной компьютерной фазово-интерференционной микроскопии исследовали особенности морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови 75 беременных в I триместре гестации с физиологической и неразвивающейся беременностью. Установлено, что в условиях неразвивающейся беременности происходят выраженные изменения тромбоцитарного звена гемостаза, которые проявляются в особенностях морфологии и функциональной активности клеток. Выявлена выраженная гетерогенность циркулирующей популяции тромбоцитов, связанная с увеличением количества макроформ, обладающих различной оптической плотностью.

■ **Ключевые слова:** неразвивающаяся беременность; гемостаз; тромбоциты; морфометрия.

Проблема неразвивающейся беременности (НБ) чрезвычайно актуальна как в социальном, так и клиническом аспектах, так как частота данного патологического процесса в структуре репродуктивных потерь достаточно высока — 10–20 %.

Большинство причин НБ хорошо изучены, разрабатываются алгоритмы их диагностики и лечения. Известно, что наибольшее значение имеют генетический, инфекционный, эндокринный и аутоиммунный факторы [2, 7]. Однако, по разным данным, в 20–40 % случаев причина потери беременности остается не до конца выясненной. Многие специалисты в качестве одной из причин неразвивающейся беременности рассматривают нарушения в системе гемостаза, обусловленные приобретенными и наследственными тромбофилиями [1, 6].

Необходимым условием для успешного развития гестационного процесса является формирование сложной сети сосудов, обеспечивающих перенос газов, питательных веществ и продуктов метаболизма между организмами матери и плода. В то же время состояние фетоплацентарной системы при НБ остается одним из малоизученных аспектов проблемы, а имеющаяся информация носит довольно противоречивый характер [4].

Важную роль в системе регуляции агрегатного состояния крови играют тромбоциты, отвечающие за начальный этап гемостаза. Широкий диапазон функциональной активности этих клеток предполагает их участие в обеспечении коагуляции, репарации сосудистой стенки, депонировании и транспорте биологически активных соединений, осуществлении защитных реакций организма [8].

В связи с этим изучение особенностей морфофункционального состояния тромбоцитов в условиях НБ с применением новейших методов компьютерной цитометрии является несомненно актуальным и перспективным.

### Цель исследования

Повышение эффективности диагностики нарушений гемостаза, приводящих к возникновению неразвивающейся беременности, с использованием критериев витальной оценки морфофункционального статуса тромбоцитов периферической крови.

### Методы исследования

Обследованы 75 беременных в I триместре гестации: 35 — с физиологической и 40 — с неразвивающейся беременностью (средний возраст  $27,5 \pm 1,4$  лет). Группу сравнения составили 20 соматически здоровых женщин репродуктивного возраста: 20–35 лет (средний возраст —  $28,3 \pm 4,1$  лет).

Венозную кровь (2–3 мл) заготавливали в пробирку из ареактивного пластика («Sarstedt Monovette», Германия) с антикоагулянтом (ЭДТА, цитрат натрия). Для приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами, кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5–7 минут [3].

Морфофункциональное состояние циркулирующих тромбоцитов *in situ* оценивали методом витальной компьютерной морфометрии на основе отечественного компьютерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» [5].

КФМ представляет собой модифицированный интерферометр Линника с модуляцией фазы опорной волны. Источником света является гелий-неоновый лазер ( $\lambda=633$  нм). Основные параметры КФМ: объектив  $\times 30$ , общее увеличение системы  $\times 5000$ , точность измерения по высоте 0,5 нм, по полю — 20 нм; дискретность изображения  $128 \times 128$ , при минимальном размере пиксела — 3 нм. Микроскоп обладает разрешением, незначительно уступающим растровому электронному микроскопу, и позволяет регистрировать параметры биологических объектов, не подвергавшихся предварительной фиксации или окрашиванию.

Взвесью нативных клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имела зеркальное напыление. Оптимальный объем выборки составлял 50 клеток. Время измерения одного интерференционного поля, соответствующего изображению одной клетки, не превышало 14 секунд. Комплексный алгоритм морфометрии клеток периферической крови предполагал автоматическое определение заданных размерных параметров изучаемых цитообъектов, статистическую обработку данных и документирование результатов в виде протоколов трех уровней: I уровень включал анализ структурно-объемных параметров (топограмма, 3-мерное изображение клетки, профиль, гистограмма распределения фазовых высот); II уровень — расчет морфометрических показателей отдельных клеток (диаметр —  $D$ , периметр —  $P$ , высота —  $H$ , площадь —  $S$ , объем —  $V$ ); оценка распределения объема и площади клетки по уровням сканирования (взаимодействие с чужеродной поверхностью); контурное изображение топографии интерференционного поля (послойная интерферограмма клетки в псевдоцвете); III уровень — интегральный морфометрический анализ клеточной популяции по мерным признакам ( $D$ ,  $P$ ,  $H$ ,  $S$ ,  $V$ ), построение цитограмм.

Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета «Statistica 6». Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, ошибок средних и среднего квадратич-

ного отклонения. Различия между сравниваемыми группами рассчитывали по критерию Стьюдента. Уровень значимости устанавливался равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

Тромбоциты, отвечающие за начальный этап гемостаза, представляют собой замечательный пример единства структуры и функции. В литературе, посвященной морфологии тромбоцитов, значительное место отводится обсуждению вопросов, касающихся механизмов функционирования этих клеток и эффективных методов их оценки [11, 13].

Установлено, что изменение формы представляет собой раннее и обратимое проявление активации тромбоцитов, которое опосредовано внутриклеточной системой сократительных микрофиламентов. В тромбоцитарной мембране возникают волны возбуждения и формируется большое количество коротких нитевидных псевдоподий или филоподий, продвигающихся по открытой канальцевой системе. В результате значительно увеличивается поверхность тромбоцитарной мембраны, что необходимо для катализа реакций гуморальной системы свертывания крови и для стабилизации тромбоцитарных агрегатов [10, 12]. Поэтому важным аспектом изучения тромбоцитов является визуальный полуколичественный или количественный анализ особенностей их конформационных изменений.

Ретроспективный анализ литературы и полученная нами база данных фазово-интерференционных изображений живых тромбоцитов позволили идентифицировать 4 морфологических типа клеток, характеризующих ту или иную степень их активации [9, 12]. Основой для дискриминации структурно измененных тромбоцитов служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина.

Рисунок 1 иллюстрирует различные формы тромбоцитов периферической крови, идентифицированных с помощью КФМ.

Важно учитывать, что параметры фазового изображения содержат информацию не только о пространственно-объемных характеристиках живой клетки, но и ее оптических свойствах, в частности, внутриклеточной анизотропии. Величина показателя преломления, измеряемая в каждой точке цитообъекта, непосредственно зависит от концентрации, химического состава, агрегатного состояния внутриклеточного вещества, наличия или отсутствия органелл и включений. Изменение любого из указанных условий находит отражение в характерных локальных трансформациях фазового изображения клетки.

Подавляющее большинство циркулирующих тромбоцитов представлено плоскими округлыми клетками с гладкой или складчатой поверхно-

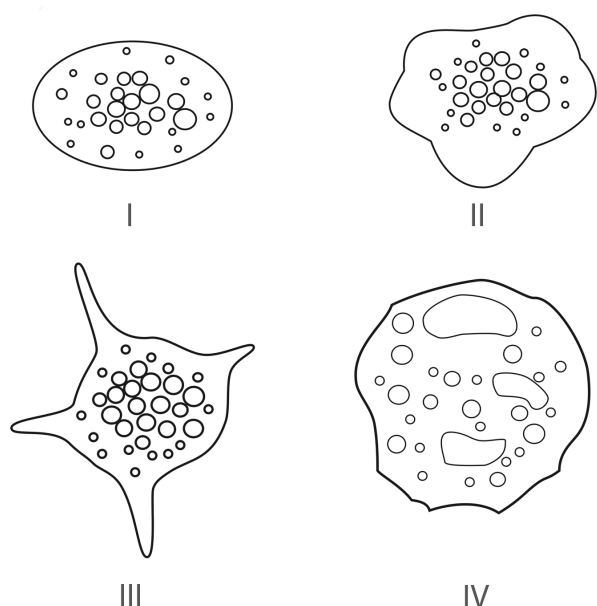


Рис. 1. Морфофункциональные типы живых тромбоцитов периферической крови: I — тромбоцит «покоя»; II — тромбоцит с низким уровнем активности; III — высоко активированный тромбоцит; IV — дегенеративно измененный тромбоцит

стью — «гладкие» и «рифленные» дискоциты, соответствующие I морфологическому типу.

К II типу тромбоцитов были отнесены клетки округлой формы с гладкой или складчатой поверхностью и 1–3 короткими (меньше диаметра клетки) отростками-псевдоподиями, являющимися выростами поверхностной мембраны — «эхиноциты» 1-го класса.

Клетки, имеющие около 2–5 длинных (больше диаметра клетки) отростков-«антенн», представляли III тип и отличались большим многообразием форм: от плоских дисков до клеток неправильной причудливой формы — «эхиноциты» 2-го класса.

Тромбоциты неправильной формы с неровной бугристой поверхностью, большим количеством отростков различной длины и многочисленными вакуолями были отнесены к IV морфологическому типу — дегенеративно-измененным клеткам.

Следует отметить, что гладкие и рифленные дискоциты являются так называемыми формами «покоя». Тромбоциты II–III типов, отличающиеся появлением отростков (псевдоподий) различного числа и длины, а также изменением их формы, связанной с перестройкой цитоскелета и структуры гранул, проявляют внешние признаки функциональной активности.

Клетки IV типа являются дегенеративно измененными, функционально неполноценными тромбоцитами, практически исчерпавшими свои биологические функции.

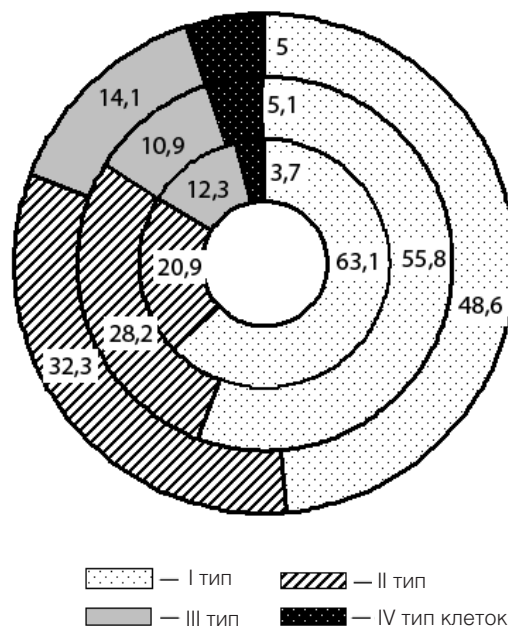


Рис. 2. Процентное соотношение морфофункциональных типов тромбоцитов периферической крови женщин вне беременности (внутренний круг), при физиологической (средний круг) и неразвивающейся (внешний круг) беременности

На рисунке 2 представлены диаграммы распределения тромбоцитов периферической крови в соответствии с принадлежностью к 4 выделенным морфологическим типам.

Установлено, что у женщин вне беременности во II фазе цикла 63 % тромбоцитов представлены клетками «покоя», 21 % — тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество клеток с длинными отростками-«антеннами» составляет 12 % (III тип), а дегенеративно-измененных (IV тип) — всего 4 %.

При физиологической беременности на сроке гестации 8–12 недель процент тромбоцитов «покоя» снижается до 56; около 28 % клеток представлены эхиноцитами с короткими отростками (II тип); практически 11 % относятся к III типу, а число дегенеративно-измененных клеток составляет 5 %.

Для популяции тромбоцитов в условиях неразвивающейся беременности характерна следующая морфологическая картина: значительное уменьшение в циркуляции тромбоцитов «покоя» (до 49 %) и высокое содержание активированных клеток (32 % — тромбоцитов II типа; 14 % — III типа; 5 % — дегенеративно-измененных тромбоцитов IV типа).

В таблице 1 суммированы средние в популяции размерные показатели тромбоцитов периферической крови. Обращает внимание увеличение средних по популяции значений диаметра (на 10 % и более), периметра (на 8,5 %) и площади (на 11 %) циркулирующих тромбоцитов у женщин с прогрессирующей беременностью. При неразви-

Таблица 1

Размерные параметры тромбоцитов периферической крови женщин вне беременности, с физиологической (ФБ) и неразвивающейся (НБ) беременностью, ( $M \pm \sigma$ )

| Группы                 | Диаметр (D), мкм | Периметр (P), мкм | Высота (H), мкм | Площадь (S), мкм <sup>2</sup> | Объем (V), мкм <sup>3</sup> |
|------------------------|------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Вне беременности, N=20 | 2,6±0,8          | 8,2±3,4           | 1,2±0,5         | 4,6±2,1                       | 1,8±1,3                     |
| ФБ, N=35               | 2,9±0,9          | 8,9±3,7           | 1,2±0,4         | 5,1±3,8 *                     | 1,7±1,3                     |
| НБ, N=40               | 3,1±1,2 *        | 9,5±4,7 *         | 1,0±0,4 *       | 6,4±3,0 *                     | 2,6±1,8 *                   |

Примечание: \* — достоверно относительно контроля, при  $p < 0,05$ .

Таблица 2

Размерные параметры макротромбоцитов периферической крови, ( $M \pm \sigma$ )

| Субпопуляции                                 | Диаметр (D), мкм | Периметр (P), мкм | Высота (H), мкм | Площадь (S), мкм <sup>2</sup> | Объем (V), мкм <sup>3</sup> |
|----------------------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Макротромбоциты высокой оптической плотности | 5,4±0,9*         | 18,6±4,1*         | 1,1±0,3*        | 16,3±6,3*                     | 5,3±2,2*                    |
| Макротромбоциты низкой оптической плотности  | 5,5±0,7*         | 19,1±3,8*         | 0,7±0,3*        | 17,9±3,5*                     | 3,1±1,9*                    |

Примечание: \* — достоверно относительно контроля, при  $p < 0,05$ .

вающейся беременности максимальные средние значения диаметра, периметра, площади и объема тромбоцитов увеличиваются на 19,2, 15,9, 39,1 и 44,4% соответственно. По-видимому, выявленные изменения связаны с появлением высокого процента активированных тромбоцитов. Кроме того, можно предположить появление в циркуляции некой субпопуляции не активированных, но крупных клеток, отличающихся большим диаметром, периметром и площадью, но низкой фазовой высотой.

Мы воспользовались возможностями компьютерного анализа, выделили и проанализировали особенности обнаруженной нами субпопуляции крупных тромбоцитов — макроформ с диаметром более 5 мкм.

Установлено, что субпопуляция макротромбоцитов также является неоднородной. Внутри этой группы клеток выявлены две категории тромбоцитов: с высокими или низкими значениями фазовой высоты и объема при практически соизмеримых величинах диаметра, периметра и площади. Средние размерные параметры макротромбоцитов с различной оптической плотностью суммированы в таблице 2.

Считается, что макроформы могут представлять собой молодые незрелые мегатромбоциты, осколки мегакариоцитов. Увеличение их процентного содержания в общем пуле циркулирующих клеток свидетельствует об активации процессов тромбоцитопоэза. Различие в оптических параметрах (фазовая высота и объем) этих клеток при равнозначных величинах геометрических параметров (диаметр, периметр и площадь) позволяют предположить, что клетки с более высокой оптической плотностью обладают хорошо сформированным полноценным гранулярным аппаратом и наоборот [14].

Установлено, что у женщин контрольной группы содержание макроформ в циркулирующей по-

пуляции не превышает 2%, при физиологической беременности (I триместр) процент макротромбоцитов составляет — 4%, при неразвивающейся беременности количество таких тромбоцитов может увеличиваться до 7%.

Представленные данные убедительно свидетельствуют о выраженных изменениях морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови обследованных пациенток, позволяют выявить особенности различных клеточных форм по их структурно-объемным показателям и рельефу поверхности, представить количественную и качественную характеристику каждой группы клеток. По нашему мнению, такая информация, описывающая множество распределением параметров, которыми являются структурные признаки тромбоцитов, может иметь большую диагностическую ценность. Является очевидным, что в условиях неразвивающейся беременности происходят выраженные нарушения тромбоцитарного звена гемостаза, которые проявляются в изменении морфологии и функциональной активности клеток.

Полученные результаты имеют важное значение, поскольку точное знание адаптивных изменений системы гемостаза при физиологическом и патологическом течении беременности позволяет проводить более успешную диагностику возможных геморрагических осложнений в акушерстве, дифференцировать различные нарушения тромбоцитарного гемостаза, проводить целенаправленную коррекцию выявленных дефектов.

## Литература

1. Бицадзе В. О., Макацария А. Д., Акинъшина С. В. Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике. Молекулярно-генетические механизмы и стратегия про-

- филактики тромбоэмболических осложнений. — М.: МИА, 2007. — 1064 с.
2. *Доброхотова Ю. Э., Савченко Т. Н.* Неразвивающаяся беременность: учебно-методическое пособие / ред. О. В. Макаров. — М.: РГМУ, 2002.
  3. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Балуда В. П. [и др.]. — Томск, 1980. — 333 с.
  4. *Макацария А. Д., Мищенко А. Л.* Вопросы циркуляторной адаптации системы гемостаза при физиологической беременности и синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания // Акуш. и гин. — 1997. — № 1. — С. 38–41.
  5. Новая технология прижизненной компьютерной фазовой микроскопии: диагностические возможности и перспективы / Василенко И. А. [и др.] // Радиоэлектроника в медицинской диагностике (оценка функций и состояния организма). — М., 1995. — С. 164–169.
  6. *Сидельникова В. М.* Привычная потеря беременности. — М.: Триада-Х, 2005. — 304 с.
  7. *Стрижаков А. Н., Игнатко И. В.* Потеря беременности. — М.: МИА, 2007. — 224 с.
  8. *Шутикова А. С.* Тромбоцитарный гемостаз. — СПб.: Изд-во СПб ГМУ, 2000. — 227 с.
  9. *Clauser S., Cramer-Bordé E.* Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders // Semin. Thromb. Hemost. — 2009. — Vol. 35, № 2. — P. 213–223.
  10. *Elliott M. A., Tefferi A.* Thrombocythaemia and pregnancy // Best Practice Research Clinical Haematology. — 2003. — Vol. 16, № 2. — P. 227–242.
  11. *Harrison P.* Assessment of platelet function in the laboratory // Hamostaseologie. — 2009. — Vol. 29, № 1. — P. 25–31.
  12. *Hartwig J. H., Barkalow K. L., Falet H.* Role for phosphoinositide 3-kinase in Fc gamma RIIA-induced platelet shape change // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2003. — Vol. 285, № 4. — P. 797–805.
  13. *Kehrel B. E.* Platelets: biochemistry and physiology // Hamostaseologie. — 2008. — Vol. 28, № 5. — P. 289–298.
  14. Results of an external proficiency testing exercise on platelet dense-granule deficiency testing by whole mount electron microscopy / Hayward C. P. [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. — 2009. — Vol. 131, № 5. — P. 671–675.

Статья представлена М. С. Зайнулиной,  
ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта,  
Санкт-Петербург

#### STRUCTURAL MORPHOLOGIC FEATURES OF PERIPHERAL BLOOD PLATELETS IN RECURRENT MISCARRIAGE

Gasparyan S. A., Chotchaeva S. M., Vasilenko I. A.,  
Kastrikin I. S.

■ **Summary:** The morphofunctional status of peripheral blood platelets in 75 women with physiological pregnancy and recurrent miscarriage were investigated at I trimester using the method of computer phase-interference microscopy. It was determined that the damages of platelet hemostasis in recurrent miscarriage are consisted cell morphology and functional activity. We detected the frank heterogeneity of circulative platelet population which was connected to increasing quantity of macro-platelets with different image density.

■ **Key words:** recurrent miscarriage, hemostasis, platelets, morphometry.

#### ■ Адреса авторов для переписки

*Гаспарян Сусанна Арташесовна* — д. м. н., профессор.

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Ставропольская государственная медицинская академия (ГОУ ВПО СтГМА), кафедра акушерства и гинекологии. 355017, Ставропольский край, г. Ставрополь, ул. Мира, 310.

**E-mail:** osipyan\_eldar@mail.ru

*Чотчаева Софья Муратовна* — главный врач, заслуженный врач РФ. Муниципальное учреждение здравоохранения «Родильный дом», г. Ессентуки (МУЗ «Роддом»). 357635, Ставропольский край, г. Ессентуки, ул. Октябрьская, 460.

**E-mail:** roddom@essstel.ru

*Василенко Ирина Анатольевна* — д. м. н., заведующая лабораторией, профессор.

ФГУ Российский геронтологический научно-клинический центр Росздрава, лаборатория компьютерной цитоморфометрии. 129226, Москва, ул. 1-ая Леонова 16.

**E-mail:** svia@rambler.ru

*Кастрикина Ирина Сергеевна* — научный сотрудник.

ФГУ Российский геронтологический научно-клинический центр Росздрава, лаборатория компьютерной цитоморфометрии. 129226, Москва, ул. 1-ая Леонова 16.

**E-mail:** svia@rambler.ru

*Gasparyan Susanna Artashesovna* — MD PhD, professor of lecturing desk of obstetrics and gynecology, professor.

Stavropol State Medical Academy, lecturing desk of obstetrics and gynecology, 310 Mira street, Stavropol, 355017, Stavropol Territory, Russia.

**E-mail:** osipyan\_eldar@mail.ru

*Chotchaeva Sofiyat Muratovna* — head doctor.

Maternity hospital 460 Oktyabr'skaya street, Essentuki, 357635, Stavropol Territory, Russia

**E-mail:** roddom@essstel.ru

*Vasilenko Irina Anatol'evna* — MD PhD, manageress of laboratory, professor. Russian gerontological scientific clinical center, laboratory of computer cytormorphometry.

1-st Leonova street, Moscow, 129226, Russia.

**E-mail:** svia@rambler.ru

*Kastrikin I. Irina Sergeevna* — research officer.

Russian gerontological scientific clinical center, laboratory of computer cytormorphometry.

1-st Leonova street, Moscow, 129226, Russia.

**E-mail:** svia@rambler.ru