

СПОНТАННАЯ И ИНДУЦИРОВАННАЯ АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ И РОДАХ

Т. П. Бондарь, А. Ю. Муратова, Е. А. Мельченко

Северо-Кавказский Федеральный университет,
Россия, 355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, д. 1

Spontaneous and Induced Platelet Aggregation during Pregnancy and Labor

T. P. Bondar, A. Yu. Muratova, E. A. Melchenko

North Caucasus Federal University,
1, Pushkin Str., Stavropol 355040, Russia

Цель. Изучить изменение показателей спонтанной агрегации тромбоцитов (Тр) у пациенток с акушерскими осложнениями, ассоциированными с генетической тромбофилией.

Материал и методы. Взятие крови у 52-х рожениц проводили в первые сутки после родов при соблюдении правил преаналитического этапа исследования. Определение генотипа по полиморфизму P1A1/ P1A2 проводили амплификационно-рестрикционным методом. Изучение геометрических показателей агрегатов Тр периферической крови пациентов проводили при помощи СЗМ «Интегра Прима». Степень достоверности различий изучаемых показателей определяли по критерию *t*-Стьюдента, уровень значимости считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В результате статистического анализа полученных данных выявили, что показатели длины агрегатов Тр здоровых беременных женщин достоверно выше показателей здоровых небеременных на всех этапах проведения исследования. Отмечали увеличение ширины, высоты и плотности агрегатов Тр у пациенток с полиморфизмом P1A1/P1A2 в гене рецепторов Тр GP IIb/IIIa. Изменения в наибольшей степени выражены на этапе инкубации длительностью 15 и 30 минут. При исследовании геометрических показателей различных экспозиций выявили, что, чем дольше проходила инкубация проб в термостате, тем сильнее различались геометрические показатели агрегатов (такие как высота, длина и ширина).

Заключение. Анализ полученных данных показал, что наличие полиморфизма P1A1/P1A2 в гене рецепторов Тр GP IIb/IIIa способствует снижению порога для тромбоцитарного ответа и усиливает спонтанную агрегацию Тр. Визуализация агрегатов убедительно доказывает и иллюстрирует увеличение скорости образования агрегатов при тромботических осложнениях беременности.

Ключевые слова: агрегационная активность тромбоцитов; беременные женщины; полиморфизм гена; сканирующая зондовая микроскопия; тромбофилия

Objective: to evaluate changes in characteristics of spontaneous platelet (Pt) aggregation in patients with obstetric complications associated with hereditary thrombophilia.

Materials and methods. Blood samples were taken from 52 recently confined women on the first day after labor; at that, ethic regulations for the pre-analytical phase were followed. Determination of P1A1/ P1A2 polymorphism genotype was performed by means of amplification-restriction analysis. Geometrical characteristics of patients' peripheral blood Pt aggregation were studied by means of AFM Integra Prima. The degree of confidence of the parameters under test was determined using the *t*-test, and the significance level was considered valid at $P < 0.05$.

Results. A statistical analysis of the findings demonstrated that the length of Pt aggregates in healthy pregnant women was significantly higher than that in healthy non-pregnant women at all study phases. Patients with the P1A1/P1A2 polymorphism in the GP IIb/IIIa Pt receptor gene demonstrated increased width, height, and density

Адрес для корреспонденции:

Татьяна Бондарь
E-mail: Tatiana_bond_st@mail.ru

Correspondence to:

Mrs. Tatiana Bondar
E-mail: Tatiana_bond_st@mail.ru

of Pt aggregates. The changes were most significant during the incubation phase lasting for 15 and 30 minutes. The study of geometric parameters of different exposures demonstrated the following: the longer the incubation period, the greater the difference between geometric parameters of the aggregates (e.g. height, length, and width).

Conclusion. The analysis of obtained data demonstrated that the presence of P1^{A1}/P1^{A2} polymorphism in GP IIb/IIIa Pt gene receptor contributes to the decrease in the platelet response threshold and enhances the spontaneous Pt aggregation. The imaging of aggregates provides strong evidence for the accelerated growth of the aggregates in thrombotic complications of pregnancy.

Key words: platelet aggregation activity; pregnant women; gene polymorphism; scanning probe microscopy; thrombophilia

DOI:10.15360/1813-9779-2016-5-16-22

Введение

Проблема ранней диагностики, лечения и профилактики артериальных и венозных тромбозов является одной из приоритетных междисциплинарных проблем. Активация системы гемостаза является важнейшим патогенетическим фактором целого ряда заболеваний внутренних органов [1].

Особое значение эта проблема приобретает в акушерстве. В экономически развитых странах, где за последние 30 лет удалось снизить материнскую смертность от кровотечений и сепсиса, тромбоэмболии заняли лидирующие позиции в ее структуре [2–4].

Беременность с первых дней сопровождается рядом динамических системных адаптационных изменений. Физиологические механизмы, лежащие в основе этого, направлены на поддержание гомеостаза и обеспечение нормального развития плода. Однако необходимо учитывать, что при беременности повышен риск развития тромбозов [5].

В последние десятилетия в клиническую практику вошло понятие тромбофилии, характеризующее генетически обусловленное или приобретенное состояние повышенного риска тромботических и тромбоэмболических осложнений [6]. Причина этих состояний чаще всего — патология системы свертывания или тромбоцитов (Тр).

Наследственные тромбоцитарные тромбофилии могут быть связаны с мутацией в гене рецептора Тр гликопротеина IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) [7]. Рецепторный комплекс GP IIb/IIIa является главным среди всех рецепторов Тр. Под влиянием определенных стимулов (аденозиндифосфата-АДФ, тромбина, тромбоксана, коллагена и др.) комплекс GP IIb/IIIa активируется и взаимодействует с различными лигандами (фибриногеном, фибронектином, фактором фон Виллебранда, витронектином, тромбоспондином), в результате чего происходит агрегация Тр [8].

Для выявления предрасположенности к развитию тромбофилических состояний требуются методы, позволяющие адекватно оценить функциональную активность Тр.

В клинической практике для определения функциональной активности Тр принято использо-

Introduction

The problem of early diagnosis, treatment, and prevention of arterial and venous thrombosis is one of most urgent interdisciplinary problems. Activation of the hemostasis system is the most important pathogenetic factor of a number of visceral diseases [1].

This problem is of primary importance for the obstetrics. In developed countries, the maternal mortality rate due to bleeding and sepsis was reduced within the last 30 years. At present, thromboembolism has become the leading cause of mortality [2–4].

From the very beginning, pregnancy is accompanied by a number of dynamic systemic adaptive changes. The underlying physiological mechanisms are intended to support homeostasis and provide normal fetal growth. However, it should be noted, that the risk of thrombosis is elevated during pregnancy. [5].

The concept of thrombophilia has been introduced into clinical practice lately. This term characterizes a hereditary or acquired condition associated with a high risk of thrombotic and embolic complications [6]. They are mainly caused by disorders of the coagulation or platelet (Pt) system.

Hereditary thrombophilias may be related to platelet glycoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) receptor mutation [7]. The GP IIb/IIIa complex is the primary one among all Pt receptors. Under the effect of certain stimuli (adenosine diphosphate-ADP, thrombin, thromboxane, collagen, etc.), the GP IIb/IIIa complex is activated and interacts with different ligands (fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin) leading to Pt aggregation [8].

Techniques that permit adequate evaluation of Pt functional activity are required in order to determine a predisposition to thrombophilia.

In clinical practice, techniques testing Pt aggregation induced by collagen, ADP, ristocetin, and other inducers are commonly used to determine the Pt functional activity. Techniques studying spontaneous Pt aggregations were used earlier; they permitted to study Pt functional characteristics under conditions imitating the natural ones. However, it is difficult to apply the existing techniques and to eval-

вать методы определения агрегации Тр, индуцированной коллагеном, АДФ, ристоцетином и другими индукторами. Ранее применялись методы изучения спонтанной агрегации Тр, позволявшие в условиях, приближенных к естественным, изучать их функциональные свойства. Однако, существующие методы трудны в исполнении и оценке полученных результатов. В связи с чем, поиск новых методов определения спонтанной агрегации представляет большой практический и научный интерес.

Преимуществом сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ) можно считать получение информации о микро- и наноархитектонике поверхности клетки, а также структур субмембранных слоев, включая цитоскелет [9].

Отсутствие работ, включающих описание формы, размера и поверхностной архитектоники Тр у пациенток с генетически обусловленной тромбофилией, послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования: изучить изменение показателей спонтанной агрегации Тр у пациенток с акушерскими осложнениями, ассоциированными с генетической тромбофилией.

Материал и методы

Обследовали 52 пациентки, находившихся в период родоразрешения в родильном отделении городской больницы г. Ставрополя. Возраст рожениц колебался от 20 до 35 лет, составив в среднем $25,2 \pm 0,6$ лет. Взятие крови проводили в первые сутки после родов с согласия лечащего врача при соблюдении правил преаналитического этапа исследования.

Структура осложнений настоящей беременности у пациенток с тромбофилией была представлена: преждевременной отслойкой нормально расположенной плаценты — 10 больных (35,7%), средними и тяжелыми гестозами — 11 (39,2%), тромбозами глубоких вен бедра — 7 (25%).

Обследованные условно были разделены на следующие группы: 1 — пациентки с тромботическими осложнениями и гетерозиготным полиморфизмом $P1A1/P1A2$ ($n=28$); 2 — женщины с физиологическим течением беременности и родов, носительством нормального варианта гена субъединиц рецепторов Тр GP IIb/IIIa ($P1A1/P1A1$) ($n=24$). Третью (контрольную) группу составили здоровые небеременные женщины без полиморфизма рецептора Тр GP IIb/IIIa ($n=18$), согласившиеся добровольно участвовать в нашем исследовании. Из обследования были исключены пациентки с другими подтвержденными мутациями генов системы гемостаза.

Определение генотипа по полиморфизму $P1A1/P1A2$ проводили амплификационно-рестрикционным методом. Источником для выделения ДНК служили пробы цельной крови, отобранной из вены пациентов в пробирки с 6% раствором ЭДТА (1:20). Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом при помощи набора «ДНКсорб Б» в соответствии с инструкцией. Амплификационные смеси готовили на основе универсального набора реактивов и препаратов для ПЦР «Амп-

уате the findings. Therefore, the search for new methods of testing of spontaneous aggregation is of a great theoretical and practical interest.

The ability to obtain data on micro- and nanoarchitectonics of a cell surface, as well of the structure of submembrane layers (including the cytoskeleton) is one of advantages of the scanning probe microscopy (SPM) [9].

Since no studies have been performed to describe the shape, size, and architectonics of Pt surface in female patients with hereditary thrombophilia, this study was carried out.

The objective of the study is to evaluate changes of parameters of spontaneous Pt aggregation in patients with obstetric complications associated with hereditary thrombophilia.

Materials and Methods

52 patients in labor in the maternity unit of the Stavropol Minicipal Hospital were examined for this study. The age of women varied from 20 to 35 years (median 25.2 ± 0.6 years). Blood samples were taken on the first day after labor; at that, ethic regulations for the pre-analytical phase were followed.

Complications of the ongoing pregnancy in thrombophilic women included premature detachment of placenta (10 patients, 35.7%), moderate and severe gestosis (11 patients, 39.2%), deep vein thrombosis (7 patients, 25%).

The enrolled patients were divided into 3 groups: 1 — patients with thrombotic complications and heterozygous polymorphism $P1A1/P1A2$ ($n=28$); 2 — women with a normal course of pregnancy and labor, carrying a normal gene of GP IIb/IIIa Pt receptor subunits ($P1A1/P1A1$) ($n=24$). The third (reference) group consisted of healthy, non-pregnant women without GP IIb/IIIa Pt receptor polymorphism ($n=18$), who were volunteers in this study. Patients with other confirmed mutations of hemostasis system genes were excluded from the study.

Determination of $P1A1/P1A2$ polymorphism genotype was performed by means of amplification-restriction analysis. Whole blood samples taken from veins into tubes with 6% EDTA solution (1:20) were the source for DNA. DNA was isolated using the sorption technique by means of a DNA-sorb B kit in accordance with the instruction. Amplification mixtures were prepared on the basis of a universal PCR reagents and products kit Ampli Sens-200-1 (manufactured by the Central Scientific Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor). Primers were synthesized by Litekh, LLC, in accordance with the sequences described by S. E. Bojesen et al. (2003). The identification of restriction fragments of DNA was performed by comparison of their sizes with the reference ones (commercial markers of molecular sizes of DNA fragments). Genotype alleles were determined in accordance with the sets of DNA restriction fragments [10].

The nanostructure of patients' peripheral blood Pt aggregation was studied by means of SPM Integra Prima in the Scientific and Educational Center of Fundamental Problems of Diagnostic Medicine under the Northern Caucasus Federal University. The technique of evaluation of spontaneous Pt aggregation was invented by a team of

ли Сенс-200-1» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Праймеры были синтезированы в ООО «Литех» в соответствии с последовательностями, описанными S.E. Bojesen и соавт. (2003). Идентификацию рестрикционных фрагментов ДНК проводили, сравнивая их размеры с эталонами в виде коммерческих маркеров молекулярных размеров фрагментов ДНК. Аллели генотипов определяли в соответствии с наборами рестрикционных фрагментов ДНК [10].

Изучение наностроения агрегатов Тр периферической крови пациентов проводили при помощи сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) «Интегра Прима» в Научно-образовательном центре «Фундаментальных проблем диагностической медицины» Северо-кавказского федерального университета. Методика оценки спонтанной агрегации Тр разработана на кафедре медицинской биохимии, клинической лабораторной диагностики и фармации (Т. П. Бондарь, А. Ю. Муратова, Е. А. Мельченко «Применение сканирующей зондовой микроскопии при исследовании спонтанной агрегации тромбоцитов у пациентов с мутацией в гене гликопротеина рецептора тромбоцитов IIb/IIIa». Наука. Инновации. Технологии; 2014; 4; 199–208).

Обогащенную Тр плазму получали центрифугированием крови при 500 об/мин в течение 10 минут. Далее образцы плазмы инкубировали в термостате при 37°C. Затем готовили препараты для микроскопии. При инкубации проб в термостате менее 5 минут агрегаты Тр не обнаруживали. Исследование проводили на 5, 10, 15, 20, 25, 30 минутных мазках. При экспозиции более 30 минут достоверных изменений не обнаружили.

Перед помещением образца в зондовый микроскоп его предварительно исследовали в оптическом микроскопе при увеличении 40×0,65. При нахождении на стекле участка с агрегатом, для помещения его на предметный столик СЗМ, с помощью стеклореза выделяли интересующую зону 10×10 мм. Был выбран режим полуконтактной атомно-силовой микроскопии с использованием кантилевера CSG 10 фирмы NT-MDT.

С помощью СЗМ стало возможным получить двухмерное и трехмерное изображение агрегатов. В каждом мазке исследовали от 10 до 25 агрегатов. Конечные результаты сканирующей зондовой микроскопии агрегатов Тр включали в себя: анализ их геометрических параметров (измерение высоты, длины и ширины) и статистические характеристики.

Степень достоверности различий изучаемых показателей определяли по критерию *t*-Стьюдента, уровень значимости считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ агрегатов проводили на фиксированных препаратах обогащенной Тр плазмы с использованием метода СЗМ. Это позволило получить основную информацию об изменении морфологических показателей тромбоцитарных агрегатов у женщин с нормальным генотипом и при полиморфизме P1A1/P1A1 гена субъединиц рецепторов Тр GP IIb/IIIa.

Геометрические показатели длины агрегатов представлены в табл. 1.

the subdepartment of medical biochemistry, clinical laboratory diagnostics, and pharmacy (T.P. Bondar', A.Yu. Muratova, E.A. Mel'nichenko. The Use of Scanning Probe Microscopy in Evaluation of Spontaneous Platelet Aggregation in Patients with Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Gene Mutation. Nauka. Innovatsii. Tekhnologii; 2014; 4; 199–208).

Platelet-rich plasma was obtained by centrifuging blood at 500 rpm for 10 minutes. Then plasma samples were incubated in a thermostat at a temperature of 37°C. Then the specimens were prepared for the microscopy. No Pt aggregates were found after a 5-minute incubation of samples in the thermostat. The test was performed in smears incubated for 5, 10, 15, 20, 25, and 30 minutes. No significant changes were found after exposure for more than 30 min.

Before placing the samples into the SPM, they were carefully studied using an optical microscope with a 40×0.65 zoom. If there were a fragment with an aggregate on the slide, then the area of interest was marked with a glass cutter (10×10 mm) prior to placing it onto a SPM stage. The test was performed at an AFM tapping mode using the CSG 10 cantilever (manufactured by NT-MDT).

The SPM permitted to obtain 2D and 3D images of aggregates. From 10 to 25 aggregates were examined in each smear. The final results of the SPM of Pt aggregates included: the analysis of their geometrical parameters (changes in the height, length, and width) and statistical characteristics.

The degree of confidence of the parameters under test was determined using the *t*-test, and the significance level was considered valid with $P < 0.05$.

Results and Discussion

The analysis of aggregates was performed in fixed Pt-rich plasma samples using the SPM technique. It permitted to obtain the general information about changes in morphological characteristics of Pt aggregates in women with normal genotype and P1A1/P1A1 polymorphism of Pt GP IIb/IIIa receptor gene subunits.

The geometrical characteristics (length) of the aggregates are presented in Table 1.

A statistical analysis of the findings demonstrated that the length of Pt aggregates in healthy pregnant women was significantly higher than that in healthy non-pregnant women at all study phases. However, this increase may reflect processes of physiological hypercoagulation taking place during the normal course of pregnancy.

The length of aggregates in patients with P1A1/P1A2 polymorphism of Pt GP IIb/IIIa receptor gene subunits significantly differed from that in healthy women in Groups 2 and 3. This phenomenon is presented in Fig.1, *b*, *c*. Patients with the P1A1/P1A2 polymorphism in the Pt GP IIb/IIIa receptor gene demonstrated increased width, height, and density of Pt aggregates, as it is seen in the images. The changes were most significant during the incubation phase lasting for 15 and 30 minutes.

Original Observations

Таблица 1. Изменение длины тромбоцитарных агрегатов в группах ($X \pm m$), мкм
Table 1. Changes in the length of thrombotic aggregates in groups ($X \pm m$), μm

Time, min	Parameter in the groups of study		
	1 (n=28)	2 (n=24)	3 (n=24)
5	44.81 \pm 2.15	22.85 \pm 0.68	16.19 \pm 0.68
10	59.32 \pm 3.15	37.39 \pm 1.33	24.67 \pm 1.03
15	79.24 \pm 3.07	53.61 \pm 2.85	37.47 \pm 2.76
20	85.61 \pm 1.92	74.97 \pm 2.42	45.74 \pm 1.29
25	93.66 \pm 3.81	84.02 \pm 2.41	57.32 \pm 2.67
30	101.6 \pm 1.3	94.24 \pm 1.83	87.54 \pm 2.03

Примечание. Здесь и для табл. 2, 3: Time, min — время, мин; Parameter in the groups of study — показатель в группах исследования. $p < 0.001$ — между группами 1 и 2; между группами 1 и 3; между группами 2 и 3.

Note. $P < 0.001$ — between Groups 1 and 2; between Groups 1 and 3; between Groups 2 and 3.

Таблица 2. Изменение ширины тромбоцитарных агрегатов в группах ($X \pm m$), мкм
Table 2. Changes in the width of thrombotic aggregates in groups ($X \pm m$), μm

Time, min	Parameter in the groups of study		
	1 (n=28)	2 (n=24)	3 (n=24)
5	28.43 \pm 1.89	16.22 \pm 0.38	12.49 \pm 0.44
10	41.41 \pm 2.95	24.64 \pm 1.11	17.62 \pm 1.53
15	57.78 \pm 4.11	33.01 \pm 1.64	24.25 \pm 1.45
20	60.01 \pm 3.11	36.32 \pm 2.07	27.26 \pm 1.59
25	71.75 \pm 2.96	63.32 \pm 3.71	38.94 \pm 2.72
30	89.38 \pm 1.95	77.89 \pm 2.39	66.24 \pm 2.61

Примечание. $p < 0.001$ — между группами 1 и 2 для 5, 10, 15, 20, 30 мин; между группами 1 и 3; между группами 2 и 3. $p < 0.005$ — между группами 1 и 2 для 25 мин.

Note. $P < 0.001$ — between Groups 1 and 2 for 5, 10, 15, 20, 30 min; between Groups 1 and 3; between Groups 2 and 3. $P < 0.005$ — between Groups 1 and 2 for 25 min.

В результате статистического анализа полученных данных выявлено, что показатели длины агрегатов Тр здоровых беременных женщин достоверно выше показателей здоровых небеременных на всех этапах проведения исследования. Однако, это увеличение может отражать процессы физиологической гиперкоагуляции, имеющей место при нормальном течении гестационного процесса.

Показатели длины агрегатов пациенток с наличием полиморфизма P1A1/P1A2 гена субъединиц рецепторов Тр GP IIb/IIIa в значительной степени отличались от показателей здоровых женщин 2 и 3 групп. Наглядно это иллюстрируют рис. 1, б, с. На изображении обращает на себя внимание увеличение ширины, высоты и плотности агрегатов Тр у пациенток, с полиморфизмом P1A1/P1A2 в гене рецепторов Тр GP IIb/IIIa. Изменения в наибольшей степени выражены на этапе инкубации 15 и 30 минут.

При проведении сравнительного анализа показателей ширины тромбоцитарных агрегатов выявили достоверные различия во всех группах обследуемых женщин. Так у здоровых беременных женщин агрегаты имели больший диаметр в сравнении с показателями женщин контрольной группы, но не достигали показателей пациенток с генетической тромбофилией (табл. 2).

Также была исследована высота тромбоцитарных агрегатов. При сравнении результатов

A comparative analysis of the Pt aggregate widths demonstrated significant differences in all study groups. In healthy women, the aggregates had a greater diameter than those in the reference group women, but the greatest diameter of aggregates was found in women with hereditary thrombophilia (Table 2).

The height of Pt aggregates was also examined. A comparison of findings demonstrated significant differences in all groups (Table 3).

The SPM study of samples demonstrated that the number of aggregates in healthy women did not differ from those with hereditary thrombophilia. These findings were confirmed by a standard technique for evaluation of Pt aggregation activity (Born G.V.R. method). However, the study of geometric parameters of different exposures demonstrated the following: the longer the incubation period, the greater the difference between geometric parameters of the aggregates (e.g. height, length, and width). This tendency may be traced in Fig. 1.

Conclusion

The analysis of findings demonstrated that geometrical parameters of Pt aggregates in women with a normal course of pregnancy and labor were slightly higher than those in the reference group women. However, it may be due to hypercoagulation typical for normal pregnancy. At the same time, the aggre-

Таблица 3. Изменение высоты тромбоцитарных агрегатов в группах ($X \pm m$), мкм
Table 3. Changes in the height of thrombotic aggregates in groups ($X \pm m$), μm .

Time, min	Parameter in the groups of study		
	1 ($n=28$)	2 ($n=24$)	3 ($n=24$)
5	1.18 ± 0.03	1.07 ± 0.02	0.961 ± 0.017
10	1.26 ± 0.02	1.18 ± 0.02	1.044 ± 0.017
15	1.31 ± 0.02	1.21 ± 0.02	1.072 ± 0.019
20	1.47 ± 0.02	1.34 ± 0.04	1.096 ± 0.025
25	1.32 ± 0.04	1.21 ± 0.04	1.161 ± 0.036
30	1.51 ± 0.02	1.43 ± 0.02	1.282 ± 0.034

Примечание. $p < 0,01$ — между группами 1 и 2; между группами 1 и 3; между группами 2 и 3 для 5, 10, 15, 20, 30 мин. $p < 0,005$ — между группами 2 и 3 для 25 мин.

Note. $P < 0.01$ — between Groups 1 and 2; between Groups 1 and 3; between Groups 2 and 3 for 5, 10, 15, 20, 30 min. $P < 0.005$ — between Groups 2 and 3 for 25 min.

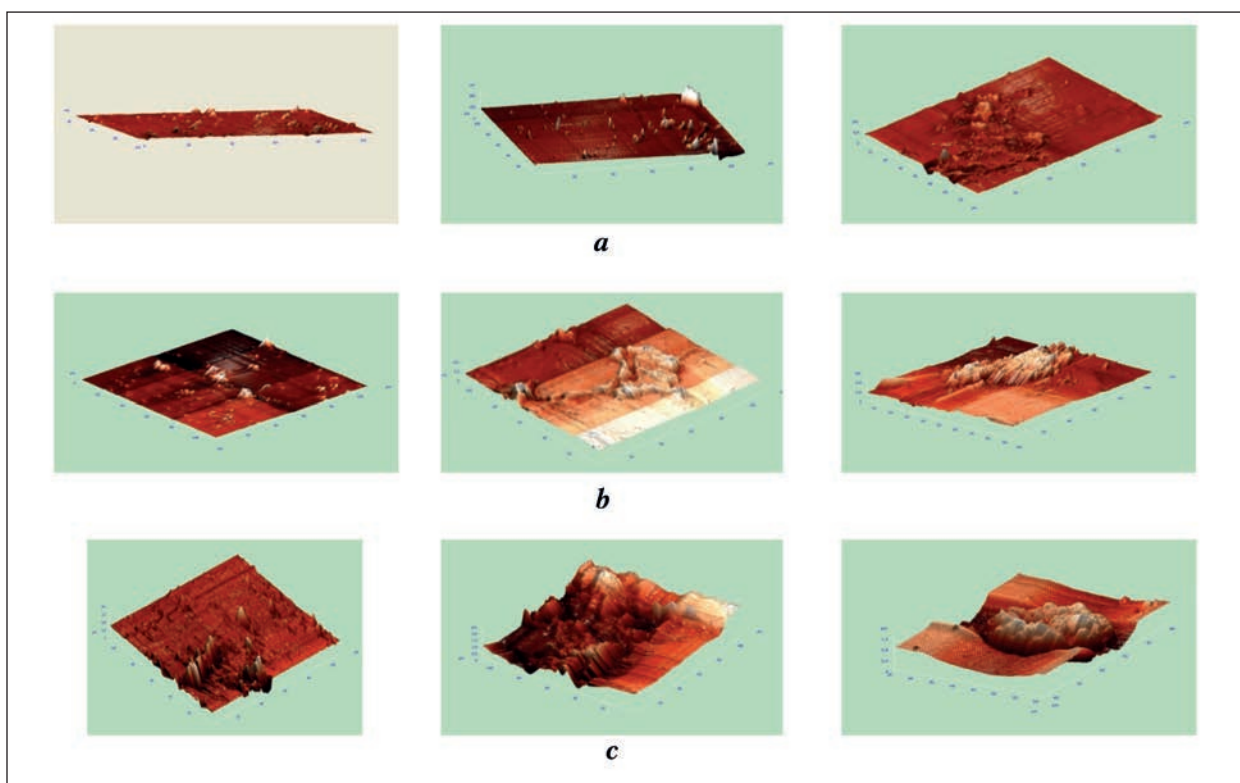


Рис. 1. 3D изображение агрегатов тромбоцитов в группах исследования.

Fig. 1. 3D image of thrombotic aggregates in the groups of study.

Note. Spontaneous aggregation, 5, 15, 30 min. *a* — in the reference group; *b* — in the healthy pregnant women; *c* — in the pregnant women with hereditary thrombophilia.

Примечание. Спонтанная агрегация на 5, 15, 30 мин. *a* — пациентки контрольной группы; *b* — здоровые беременные женщины; *c* — беременные с генетической тромбофилией.

также были выявлены достоверные отличия во всех группах (табл. 3).

Исследование препаратов с использованием сканирующего зондового микроскопа показало, что количество агрегатов у здоровых женщин и пациенток с генетической тромбофилией существенно не отличалось. Эти данные были подтверждены с помощью традиционной методики исследования агрегационной активности Тр методом Born G. V. R. Однако при исследовании геометрических показателей различных экспозиций выявили, что, чем дольше проходила инкубация

агрегатов в нормальной беременности, тем меньше они, чем больше — в пациентках с осложнениями беременности, вызванными тромбофилией.

Таким образом, наличие полиморфизма P1A1/P1A2 в гене рецептора P1b/IIIa способствует снижению порога ответа тромбоцитов и усиливает спонтанную агрегацию.

В ходе исследования было показано, что оценка спонтанной агрегации тромбоцитов позволяет оценить их естественную функциональную активность. Изучение агрегатов предоставляет убедительные доказательства ускоренного роста агрегатов в тромботических осложнениях.

Original Observations

проб в термостате, тем сильнее различались геометрические показатели агрегатов (такие как высота, длина и ширина). Более наглядно данную тенденцию можно проследить на рис. 1.

Заключение

Анализ полученных данных показал, что геометрические параметры агрегатов Тр женщин с физиологически протекающей беременностью и родами несколько выше показателей женщин контрольной группы. Однако, это может быть следствием повышения коагуляционного потенциала крови при физиологической беременности. Но в то же время размеры агрегатов при нормальной беременности не достигают геометрических показателей агрегатов пациентов с акушерскими осложнениями, обусловленными тромбофилией.

Таким образом, наличие полиморфизма P1A1/P1A2 в гене рецепторов Тр GP IIb/IIIa спо-

собствует снижению порога для тромбоцитарного ответа и усиливает спонтанную агрегацию Тр. Проведенное исследование показало, что изучение спонтанной агрегации Тр позволяет оценить их естественную функциональную активность. Визуализация агрегатов убедительно доказывает и иллюстрирует увеличение скорости образования агрегатов при тромботических осложнениях беременности. Метод СЗМ может быть использован с большой степенью надежности для фундаментальных исследований морфофункциональных свойств Тр, а также в клинико-лабораторной диагностике тромботических состояний различного генеза.

Литература

1. Александров А.А. Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний с детства: проблемы, успехи. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2012; 22 (2): 96–106.
2. Main E.K. Maternal mortality: new strategies for measurement and prevention. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2010; 22 (6): 511–516. <http://dx.doi.org/10.1097/GCO.0b013e3283404e89>. PMID: 20978441
3. Баринов С.В., Медянникова И.В., Долгих В.Т. Оценка эффективности лечения массивных акушерских кровотечений. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (3): 6–14. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-3-6-14>
4. Тимохова С.Ю., Голубцов В.В. Комплексные мероприятия по снижению перинатальной кровопотери. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (3): 15–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-3-15-24>
5. Макацария А.Д., Бицадзе В.О., Акиншина С.В. Тромбозы и тромбоэмболии в акушерско-гинекологической клинике: молекулярно-генетические механизмы и стратегия профилактики тромбоэмболических осложнений. М.: МИА; 2007: 1064.
6. Радзинский В.Е. Акушерская агрессия. М.: Медиабюро Статус презенс; 2011: 700.
7. Муратова А.Ю., Бондарь Т.П., Сафонова Л.Г. Показатели тромбоцитарного звена гемостаза в диагностике тромбофилий у беременных. *Клин. лаб. диагностика*. 2008; 9: 10b–10.
8. Хаспекова С.Г., Сироткина О.В., Шиманова Ю.В., Мазуров А.В. Вариации содержания гликопротеина IIb-IIIa (альфаIIb/бета3 интегрин) у здоровых доноров. Влияние на агрегационную активность тромбоцитов и эффективность действия аспирина. *Биомедицинская химия*. 2008; 54 (3): 361–371. PMID: 18712091
9. Бондарь Т.П., Мельченко Е.А. Использование сканирующей зондовой микроскопии для оценки состояния периферического звена эритронов у детей. *Вестн. Северо-Кавказского федерального университета*. 2013; 1 (34): 113–115.
10. Bojesen S.E., Juul K., Schnohr P., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G.; Copenhagen City Heart Study. Platelet glycoprotein IIb/IIIa P1(A2)/P1(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42 (4): 661–667. PMID: 12932598

Поступила 02.06.16

References

1. Aleksandrov A.A. Profilaktika serdechno-sosudistykh zabolevanii s detstva: problemy, uspekhi. [Cardiovascular prevention from childhood: challenges and successes]. *Kardiovaskulyarnaya Terapiya i Profilaktika*. 2012; 22 (2): 96–106. [In Russ.]
2. Main E.K. Maternal mortality: new strategies for measurement and prevention. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2010; 22 (6): 511–516. <http://dx.doi.org/10.1097/GCO.0b013e3283404e89>. PMID: 20978441
3. Barinov S.V., Medyanikova I.V., Dolgikh V.T. Otsenka effektivnosti lecheniya massivnykh akusherskikh krvotochenii. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Evaluation of the efficiency of treatment for massive obstetric hemorrhage. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (3): 6–14. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-3-6-14>. [In Russ.]
4. Timokhova S.Yu., Golubtsov V.V. Kompleksnye meropriyatiya po snizheniyu perinatalnoi krvopoteri. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Comprehensive measures for reducing perinatal blood loss. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (3): 15–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-3-15-24>. [In Russ.]
5. Makatsariya A.D., Bitsadze V.O., Akinshina S.V. Trombozy i tromboembolii v akushersko-ginekologicheskoi klinike: molekulyarno-geneticheskie mekhanizmy i strategiya profilaktiki tromboembolicheskikh oslozhnenii. [Thrombosis and thromboembolism in obstetric and gynecological clinic: molecular-genetic mechanisms and strategy for the prevention of thromboembolic complications]. Moscow: Meditsinskoe Informatsionnoe Agentstvo; 2007: 1064. [In Russ.]
6. Radzinsky V.E. Akusherskaya agressiya. [Obstetric aggression]. Moscow: Mediabyuro Status prezents; 2011: 700. [In Russ.]
7. Muratova A.Yu., Bondar T.P., Safonova L.G. Pokazateli trombotsitarnogo zvena gemostaza v diagnostike trombofilii u beremennykh. [Platelet hemostatic parameters in the diagnosis of thrombophilias in pregnant women]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2008; 9: 10b–10. [In Russ.]
8. Khaspekova S.G., Sirotkina O.V., Shimanova Yu.V., Mazurov A.V. Variatsii soderzhaniya glikoproteina IIb-IIIa (alfaIIb/beta3) u zdorovykh donorov. Vliyanie na agregatsionnyuyu aktivnost trombotsitov i effektivnost deistviya aspirina. [Variations in glycoprotein iib-iii-a (6iib/b3-integrin) content in healthy donors. Influence on platelet aggregation activity and efficacy of aspirin action]. *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2008; 54 (3): 361–371. PMID: 18712091. [In Russ.]
9. Bondar T.P., Melchenko E.A. Ispolzovanie skaniruyushchei zondovoi mikroskopii dlya otsenki sostoyaniya perifericheskogo zvena eritrona u detei. [The use of scanning probe microscopy for the assessment of children's peripheral level erythron]. *Vestnik Severo-Kavkazskogo Federalnogo Universiteta*. 2013; 1 (34): 113–115. [In Russ.]
10. Bojesen S.E., Juul K., Schnohr P., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B.G.; Copenhagen City Heart Study. Platelet glycoprotein IIb/IIIa P1(A2)/P1(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 42 (4): 661–667. PMID: 12932598

Submitted 02.06.16