

УДК 612.115:599.8

ГЕМОКОАГУЛЯЦИЯ У ЗДОРОВЫХ ОБЕЗЬЯН МАКАК РЕЗУСОВ И ПАВИАНОВ ГАМАДРИЛОВ СУХУМСКОГО ПИТОМНИКА

Фоменко В.Н., Институт экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, Сухум, Абхазия, instpath@mail333.com

Шариа М.И., Институт экспериментальной патологии и терапии АН Абхазии, Сухум, Абхазия, instpath@mail333.com

Многие сведения о сходстве и родстве обезьян с человеком были известны ещё в первой половине XX века. В основном это были данные по эмбриологии, морфологии и физиологии обезьян, несколько позже начались исследования по изучению системы гемостаза, преимущественно оценивалось общее количество тромбоцитов. Постепенно исследования в этом направлении расширялись в связи с увеличением интересов исследователей к использованию обезьян в различных экспериментах, особенно касающихся кровяной системы и болезней крови. При этом возникает необходимость получения показателей у здоровых обезьян, что особенно важно, для сравнительного изучения системы гемостаза обезьян и человека. Сегодня на обезьянах успешно моделируют многие заболевания человека. Поэтому оценка нормативов системы гемостаза не потеряла своей актуальности.

Проанализировав имеющиеся в доступной нам литературе данные по исследованию гемостаза у здоровых обезьян макак резусов и павианов гамадрилов, мы выявили большой разброс в показателях тестов, отсутствие данных по полу и возрасту; использование несопоставимых методов и многое другое. При этом следует сказать, что система гемостаза у макаков резусов исследовалась чаще, чем у павианов гамадрилов, об этом свидетельствуют единичные работы.

По разным авторам выявлены следующие колебания в показателях гемостаза: число тромбоцитов у макак резусов колеблется от $23,0$ до $75 \cdot 10^9$ /л, а у павианов гамадрилов – от $15,0$ до $53,0 \cdot 10^9$ /л. Функция тромбоцитов и эндотелия сосудов исследовалась только у макак резусов, так тромбоцитарный фактор 4 соответствовал 4,9 сек., длительность кровотечения – 2,5 мин, количество теряемой крови – 5,8 мг. У павианов нет данных. Время свертывания и другие показатели коагулограммы составляли соответственно у макак 1,5-3,5 мин., у павианов – 4-6 мин; протромбиновое время соответственно 12 и 20 сек; АЧТВ – 20 и 50 сек; тромбиновое время – 6 и 11 сек; тромботест IV-V степень; ретракция – 50 и 75%; концентрация фибриногена 280 и 500 мг%; фибринолиз по эуглобулиновой фракции 240 и 360 мин. (Krise, 1960, Seaman et al, 1968, Abildgaard et al., 1971, Bourne, 1975, Kelly et al, 1986, Sehgal et al, 1987, Tanimoto et al, 1988).

Такая оценка гемостаза привела нас к необходимости иметь собственные нормативы по ряду коагуляционных тестов у основного вида обезьян Сухумского питомника. Исследователям – приматологам хорошо известно, что в нашем институте уже многие годы ведутся исследования по изучению соматического состояния обезьян в зависимости от условий содержания, а также по экспериментальному воспроизведению на этих животных различных патологических состояний (Лапин, 1977, Лапин и др., 1987). Исследования по изучению состояния гемостаза здоровых и больных обезьян вида макак и павианов также проводились в институте (Уварова, 1975, Фоменко, 1973, 1979).

Представленные в данной работе материалы были получены нами за период 1985-1992 гг., благополучный для животных по содержанию, кормлению, разведению (размножению). Исследование гемостаза проводилось с использованием более

совершенных, стандартизованных по контактной активации методов с максимальным соблюдением необходимых требований по взятию и технической обработке материала – образцов крови обезьян.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованные обезьяны были рождены в Сухумском питомнике или привезены из мест естественного обитания и прошли карантинные мероприятия, приучены к процедуре исследования и не имели выраженных стрессовых реакций. В обследование брались только клинически здоровые обезьяны.

Группа макак резусов включала 31 обезьяну, которые по полу и возрасту распределялись следующим образом: 7 – подростки в возрасте от года до 3 лет. Остальные 23 – составляли группу половозрелых обезьян в возрасте от 4 до 15 лет, самцы – 19 и самки – 5. В группе павианов было 33 обезьяны, 7 из которых подростки, 8 – самцы, 18 – самки.

Кровь для исследования брали утром натощак, шприцом из локтевой вены в силиконированные пробирки, стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия, в соотношении 9:1. Гематокритный показатель исследуемой крови соответствовал норме. Количество взятой крови от обезьяны одновременно составляло 6–10 мл. Для подсчета тромбоцитов использовали капиллярную кровь из верхнего участка ушной раковины. Тромбоцитарную плазму получали путем центрифугирования крови в режиме 1500 об/мин в течение 8-10 мин, а безтромбоцитарную плазму – в режиме 3000 об./мин – 30 минут.

Количество тромбоцитов, функциональную их способность и коагулограмму мы исследовали общепринятыми методами (Балуда и др., 1980, Баркаган и др., 1978). Все материалы обработаны статистически по Стьюденту, методом малых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клеточный компонент гемостаза

По числу тромбоцитов в сравниваемых группах макак резусов и павианов гамадрилов между подростками и взрослыми обезьянами, а среди взрослых особей между самцами и самками выявлен, хотя и недостоверно, некоторый рост тромбоцитов у подростков и самок (табл. 1). Тромбоциты обоих видов обезьян на мазках окрашенных по Романовскому–Гимза выглядели небольшими (до 4 мкм) округлыми образованиями с хорошо видимой в микроскопе, при увеличении в 900-1000 раз, центральной зернистой зоне – *грануломером*, расположенным диффузно или единым конгломератом. По периферии тромбоцита расположена бесструктурная зона – *гиаломер*. В нем иногда наблюдаются выросты – псевдоподии и умеренная вакуолизация. Согласно принятому разделению тромбоцитов по степени зрелости, у обследованных обезьян мы также различали – юные, зрелые, старые, формы раздражения и дегенеративные. Наибольший процент (до 85-87) составляли зрелые формы тромбоцитов.

Функциональная способность тромбоцитов у здоровых обезьян, оцениваемая тестом адгезивности к стеклоткани и ретракцией плазменного сгустка, была довольно высокой, особенно у самок и подростков обоих видов обезьян ($P_1 < 0,02$). Другие характеристики функционального состояния тромбоцитов – активность 3 и 4 фактора тромбоцитов нам удалось исследовать только у взрослых павианов гамадрилов, из-за существующих ограничений взятия больших объемов крови у мелких обезьян (подростков и макак).

Определение тромбоцитарных факторов 3 и 4, как известно, используется для оценки реакции «высвобождения». В одних случаях – для выявления активации тромбоцитарного гемостаза, в других – для оценки оптимума условий хранения

концентрата тромбоцитов, в-третьих – для контроля эффективности терапии антитромботическими препаратами (Лаврова и др., 1986). Полученные нами результаты исследований факторов 3 и 4 отражают довольно высокую активность и отсутствие различий по полу (табл. 1). Данные у здоровых людей – 3 фактор – соответствует 30 сек, а фактор 4-4,5 сек. (Tanimoto et al., 1988).

Таблица 1
Характеристика клеточного звена гемостаза здоровых обезьян (1985-1992 гг.)

Показатели	Макаки резусы			Павианы гамадрилы		
	Подростки n = 7	Самцы n = 19	Самки n = 5	Подростки n = 7	Самцы n = 8	Самки n = 18
Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$	30,6 \pm 2,7 20,0-40,0	27,5 \pm 3,8 18,0-35,0	30,7 21,0-38,0	32,4 \pm 1,5 27,0-37,0	23,5 \pm 2,1 20,0-30,0	28,7 \pm 1,1 26,0-40,0
Адгезия (%)	39,1 \pm 2,0 31,0-48,0	30,7 \pm 3,0 21,0-45,3	44,2 46,0-60,0	41,0 \pm 4,0 25,0-66,0	38,3 \pm 8,6 20,0-60,0	55,3 \pm 8,5 36,0-68,0 $P_1 < 0,02$
Ретракция через 2ч %	27,5 \pm 1,5 20,0-35,0	21,6 \pm 2,0 14,0-30,0	33,1 \pm 2,6 27,0-40,0 $P_1 < 0,01$	31,4 \pm 2,0 18,0-45,0	22,3 \pm 3,8 10,0-50,0	35,6 \pm 11,6 10,0-75,0
Фактор 3 (сек)				18,4 \pm 2,0 15,0-27,0	25,0 20,0-32,0	25,8 \pm 2,8 20,0-40,0 $P_1 < 0,05$
Фактор 4 (сек)					4,8 3,0-5,4	5,1 \pm 0,2 3,0-6,8
Индекс потребл. протромбина (%)	46,0 43,0-60,0	45,3 \pm 5,5 30,0-57,0	35,0 24,0-41,0	35,1 \pm 3,9 20,0-43,0	49,1 35,0-58,0	37,7 \pm 2,1 31,0-44,0

Плазменные компоненты гемостаза

Результаты сравнительного исследования плазменных компонентов системы гемостаза представлены в таблице 2. Для ориентировочного исследования гемокоагуляции используется тест на свертываемость цельной крови по методу Ли-Уайта.

В группе макак этот тест был несколько короче, чем у павианов ($P < 0,001$), а внутри каждого из видов – у подростков и самок. Для выявления скрытой гиперкоагуляции обычно используется тест – силиконовое время плазмы, который исследует время рекальцификации плазмы в условиях силиконирования, т.е. при низкой контактной активации процесса свертывания крови. Укорочение силиконового времени мы наблюдали у самок макак (115 сек $P < 0,001$) и подростков павианов – 160 сек $P_1 < 0,05$ (табл. 2). Определение времени свертывания плазмы в условиях стандартизованной контактной активации процесса каолином, также позволяет в определенной степени ориентироваться в наличии признаков гиперкоагуляции. Укорочение каолинового времени богатой плазмы мы наблюдали только у самок павианов (53,5 сек), в группе резусов этот показатель не исследовался. Тест коалин-кефалинового времени свертывания (ККВС) особо чувствителен к дефициту плазменных факторов свертывания и к избытку в крови антикоагулянтов. ККВС мы также могли исследовать только в группе павианов, при этом обнаружена некоторая тенденция к укорочению времени только у самцов (45 сек).

Таблица 2

Коагулограмма здоровых обезьян (1985-1992 гг.)

Показатели	Макаки ресурсы			Павианы гамадрилы		
	Подростки n = 7	Самцы n = 19	Самки n = 5	Подростки n = 7	Самцы n = 19	Самки n = 18
1	2	3	4	5	6	7
Вр. свертыв. кр. (мин)	3,4±0,1 3,0-5,0	4,1±0,1 2,5-7,0	3,7±0,7 2,0-6,0	6,0±0,3 5,0-6,5	6,5±0,3 5,0-8,0	4,8±0,5 3,0-6,0 P<0,001
Силикон. время (сек)	185,0±16,0 140,0-260,0	164,0±9,3 130,0-190,0	115,0±3,2 100,0-120,0 P₁<0,01	160,0±15,2 180,0-210,0	210,0 180,0-240,0	195,0±8,3 150,0-210,0 P₁<0,05
Каол. время бед. пл. сек				79,0±5,6 70,0-100,0	80,0 70,0-85,0	79,3±2,0 75,0-90,0
Каол. время бог. пл. сек.				60,6±3,6 53,0-75,0	55,0 45,0-70,0	53,5±1,4 50,0-60,0
ККВС (сек)				50,2±1,6 45,0-55,0	45,0 40,0-55,0	49,2±3,2 45,0-55,0
АКТ % А	25,3±3,5 20,0-36,0	12,9±1,2 6,5-20,0	14,0±1,7 6,0-20,0 P₁<0,01	17,7±3,4 8,0-24,0	16,5±3,0 11,0-20,0	19,4±3,0 11,0-24,0
АКТ % МА	72,2±8,1 44,0-79,0	72,1±8,6 54,0-79,0	53,8±5,2 44,0-73,0	65,4±5,0 44,0-65,0	59,0 54,0-65,0	66,1±4,7 54,0-79,0

1	2	3	4	5	6	7
АКТ % ИИТ	4,2 26,6-6,7	5,7±0,4 3,2-6,9	4,0 3,5-4,7	2,5±0,2 2,1-3,2	2,4 2,0-3,5	3,4±0,3 2,6-4,7
Протр. вр. (сек)	25,2±3,1 21,0-30,0	21,7±0,8 20,0-25,0	23,0±1,3 17,0-30,0	22,4±0,7 18,0-25,0	21,6±0,62 20,0-25,0	20,7±1,4 15,0-25,0
Тромб. вр. (сек)	15,4 15,0-18,0	15,0±0,7 13,0-16,0	14,2±0,6 13,0-15,0	14,4±2,3 10,0-23,0	14,0 13,0-16,0	15,5±0,5 10,0-18,0
Фибриноген мг%	390,0±21,0 350,0-450,0	353,0±21,0 250,0-550,0	450,0 400,0-600,0	500,0±46,0 200,0-650,0	425,0±27,4 390,0-450,0	464,0±31,0 400,0-550,0
Фибриноли (мин)	16,5 15,0-18,0	20,5±5,9 20,0-40,0	25,0 16,0-34,0	18,6 15,0-25,0	6,5 6,0-13,0	8,1±0,7 5,0-10,0
Этанол. тест (+ -)	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.	отриц.
Тромботест (ст.)	IV-VI	IV - V	V - VI	IV - V	IV - V	V - VI

P – видовые различия между макаками и павианами; P₁ – возрастные различия между подростками и взрослыми.

Общее представление о состоянии прокоагулянтного и антикоагулянтного звеньев системы дает нам аутокоагуляционный тест (АКТ). Тест отражает внутренний механизм свертывания крови, динамику нарастания, а затем инактивации тромбопластин-тромбиновой активности исследуемой крови в течение 1 часа инкубации. Использование гемолизата эритроцитов обеспечивает стандартизацию фосфолипидной и контактной активации начальной фазы процесса свертывания крови. При анализе его параметров видно, что у обоих видов обезьян показатели довольно близкие. Тем не менее, показатель «А», отражающий свертывающую активность плазмы на 2-ой минуте инкубации гемолизат-кальциевой смеси, был выше только у подростков макаков резусов (25,3 % $P_1 < 0,01$). Максимальная свертывающаяся активность «МА» определялась на 8 минуте у макаков и на 9 минуте у павианов. Наибольший процент активности наблюдался у подростков и самцов макаков (72%), в группе павианов колебания незначительные (табл. 2). Индекс инактивации тромбопластин-тромбиновой активности (ИИТ), отражающий антикоагулянтные процессы в исследуемой крови, заметно повышенным был в группе макаков (4-5,7%), преимущественно самцов, а в группе павианов только у самок (3,4%).

Более стабильными для обоих видов обезьян были показатели тромбоинового и протромбинового времени, последний отражает внешний механизм свертывания содержанием II, V, VII, X фактора (табл. 2). Повышенный уровень фибриногена отмечался у подростков (400-500 мг%) и самок (450 мг%) обоих видов обезьян. Процесс фибринолиза по тесту со стрептокиназой, показывал заторможенное время лизиса сгустка плазмы у макаков (16-25 мин), по сравнению с павианами (6,5-18,6 мин).

Наличие продуктов паракоагуляции фибрин-мономерных комплексов мы проводили с помощью этанолового теста, в результате мы получили отрицательный ответ. Степень тромботеста была высокой – V-VI.

ОБСУЖДЕНИЕ

При сопоставлении результатов наших исследований с данными литературы по здоровым людям обнаружено сходство по числу тромбоцитов и морфологической их структуре. Тенденция к увеличению числа тромбоцитов и показателей свертывания крови у самок обезьян также согласуется с данными литературы у здоровых людей, где показано повышение активности всего процесса свертывания крови у женщин (Промахина и др., 1975). Однако имеются и некоторые различия с данными человека. Так, по плазменным компонентам система гемостаза обследованных нами видов обезьян выглядит более активным процессом. У обезьян короче время свертывания, силиконовое время, каолин-кефалиновое время, более высокая концентрация фибриногена. Увеличенный, особенно у макаков, индекс инактивации тромбопластина и тромбина в АКТ согласуется с данными (Hawkey, 1968, 1970), обнаружившими у обезьян вида макаков, по сравнению с человеком, также высокий уровень антитромбинов и плазминогена.

Проведенный анализ различий по виду показывает, что у макаков более активный процесс свертывания, по сравнению с павианами, судя по укороченному времени свертывания, силиконовому времени и заторможенному фибринолизу. Наши данные коррелируют с имеющимися в литературе данными по макакам резус (Bourne, 1975, Kelly et al., 1986, Sehgal et al., 1987).

Изучение возрастных различий выявило по ряду показателей гемостаза достоверные различия – у макаков резусов по силиконовому времени и показателю «А» в АКТ, а в группе павианов гамадрилов по адгезивной способности тромбоцитов, 3 тромбоцитарному фактору и силиконовому времени. Коагуляционная активность не имела односторонней направленности. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, подчеркивающих нестабильную направленность коагуляционной

способности крови в раннем возрасте у человека, т.к. ещё продолжается совершенствование деятельности органов и систем, синтезирующих про- и антикоагулянты (Маркосян, 1968, Уварова, 1975, Abildgaard et al., 1971, Tanimoto et al., 1988).

Таким образом, система гемостаза у обследованных нами здоровых обезьян макак резусов и павианов гамадрилов в целом сходна с тем, что известно для человека, однако имеющиеся некоторые различия необходимо учитывать при проведении экспериментов на данном виде животных. Видовые различия позволяют рассматривать павианов гамадрилов как более удобную модель для изучения действия антикоагулянтов и других лечебных препаратов на систему свертывания крови. У макак резусов гемостаз более активен, что также необходимо учитывать при выполнении биологических экспериментов на этом виде животных.

ЛИТЕРАТУРА

- Балуда В.Л., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск, 1980. 313 с.
- Баркаган Л.З., Цемахович В.А. Изучение механизма аутокоагуляционного теста // Лаб. Дело, 1978. №8. С. 485-489.
- Лаврова А.А., Якутин Г.А., Смолянский А.Я. Фактор 4 тромбоцитов. Свойства и клиническое значение его определения // Лаб. Дело, 1986. № 2. С. 73-76.
- Лалин Б.А. Некоторые итоги и перспективы использования обезьян в медико-биологических экспериментах // Вестник АМН СССР, 1977. №8. С. 3-12.
- Лалин Б.А., Джикидзе Э.К., Фридман Э.П. Руководство по медицинской приматологии. М.: Медицина, 1987. 191 с.
- Маркосян А.А. 1968. Онтогенез системы свертывания крови. Л.: Наука. 187 с.
- Промахина Е.К., Юрлов В.И. Влияние количества тромбоцитов и эритроцитов здоровых людей на их коагулирующую активность // Система свертывания крови и фибринолиз. Тезисы IV Всесоюзной конференции. Саратов, 1975. Ч. 1. С. 185-187.
- Уварова В.И. Система гемостаза у макаков резусов // Вопросы антропологии, 1975. Вып. 49. С. 175-180.
- Фоменко В.Н. Сравнительное изучение свертывающей системы крови здоровых бурых макак // Вопросы антропологии, 1973. Вып. 44. С.149-155.
- Фоменко В.Н. Состояние системы гемостаза при гемобластозе у обезьян. Автореферат канд. дис. М., 1979. 24 с.
- Abildgaard C.F., Harrison J., Johnson C.A. Comparative study of blood coagulation in nonhuman primates // J. Appl. Physiol., 1971. 30. 3. P. 400-405.
- Bourne J.H. The Rhesus Monkey // New York etc. Acad. Press., 1975. Vol. 2. P. 436
- Hawkey C.N., Symons C.A. Comparative Study of Blood Coagulation in Human and Non-human Primates // In: Pvoc. 2nd: Int. Congr. Primat. Atlanta, GA. 1968. 2. P. 87-94. (Karger, Basel / New York, 1960).
- Hawkey C.N. Fibrinolysis in animals // In: Symp.Zool.Sci. London, 1970. 27. P.133-150.
- Kelly C.A., Gleiser C. A. Selected Coagulation Referens Values for Adult and Juvenile Baboons // Lab. Animal Sciene April., 1986. V. 36. No. 2. P. 173-175
- Krise G.M. Hematology of the normal monkey // Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960. 85. Art. 3. P. 803-810.
- Seaman A.Y., Malinov M.R. Blood clotting in nonhuman primates // Lab. Anim.Care., 1968. 18. 1. P. 80-84.
- Sengal L.R., Sehgal H.L., Rosen A.G., Gould S.A. Coagulation profile in a baboon colony (Papio species) // Clin. Chem., 1987. V. 33. P. 1036.