

На правах рукописи

Леонтьев Михаил Александрович

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТРОМБОЦИТОВ
НОВОРОЖДЕННЫХ В НОРМЕ, ПОСЛЕ ПЕРЕНЕСЕННОЙ ГИПОКСИИ
И ПРИ СИНДРОМЕ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА**

03.03.04 — клеточная биология, цитология, гистология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Саратов – 2020

Работа выполнена в частном учреждении образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «РЕАВиЗ»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент **Родзаевская Елена Борисовна**

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Масляков Владимир Владимирович**

Официальные оппоненты:

Мазуров Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор; институт экспериментальной кардиологии, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский медицинский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации; главный научный сотрудник, исполняющий обязанности руководителя лаборатории клеточной адгезии.

Воронцова Зоя Афанасьевна – доктор биологических наук, профессор; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации; кафедра гистологии; заведующая кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «___» ____ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 900.006.03 при Медицинской академии имени С.И. Георгиевского (структурное подразделение) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский Федеральный университет имени В.И. Вернадского», Российской Федерации, Республика Крым, 295051, г. Симферополь, бульвар Ленина, 5/7.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (295007, Республика Крым, г. Симферополь проспект Академика Вернадского, 4) и на сайте (<http://www.cfuv.ru>) федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»

Автореферат разослан «___» ____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Евгения Юрьевна Зяблицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Тромбоциты являются центральным компонентом гемостаза, осуществляющим связь между эндотелием сосудистой стенки, плазменными белками и клетками крови с целью адаптивного взаимодействия и предотвращения развития кровотечения при появлении поврежденного участка эндотелия [Budak Y.U. et al., 2016]. Не вызывает сомнения, что биологическая активность и функциональная полноценность тромбоцитов зависит от их морфологической целостности [Мазуров А.В., 2011]. Показано, что к развитию кровотечения может приводить не только уменьшение количества тромбоцитов, но и изменение их морффункциональных свойств [Васильев С.А. с соавт., 2010].

Оценка морфологии и функциональной способности тромбоцитов у новорожденных детей, является сложной задачей, так как используемые тесты часто требуют больших объемов крови, наличия специализированного оборудования, а моделируемые условия далеки от естественных; кроме того, неонатальный гемостаз существенно отличается от такового у взрослых, а интерпретация результатов требует знания нормальных показателей для конкретного гестационного возраста [Haley K. M. et al., 2014].

Ввиду особенностей функционирования системы «мать–плацента–плод», в антенатальном периоде ребенок зачастую подвержен воздействию гипоксии. Тяжелая антенатальная гипоксия является одной из основных причин высокой перинатальной смертности и заболеваемости в Российской Федерации [Еремина О.В., 2014]. Особый интерес представляет влияние гипоксии на тромбоциты, поскольку отмечено, что у новорожденных, перенесших гипоксию, нередко имеет место возникновение тромбоцитопении в первые 72 часа жизни [Nadkarni J. et al., 2012], причем у недоношенных и маловесных детей тромбоцитопения, как следствие внутриутробной гипоксии, встречается чаще, чем у доношенных и рожденных в срок [Carr R. et al., 2015]. Установлено, что у новорожденных с тромбоцитопенией связано повышение смертности от таких заболеваний как внутрижелудочковое кровоизлияние и тромбогеморрагический синдром [Elmoneim A.A. et al., 2015].

В ряде исследований отмечено, что при синдроме системного воспалительного ответа (ССВО), который сопровождает большое количество заболеваний у новорожденных, также развивается тромбоцитопения и наблюдается изменение тромбоцитарных показателей, позволяющих косвенно судить о морфологии и функциональной активности тромбоцитов [Wasiluk A. et al., 2011; Arif S.H. et al., 2012; Sekmez F. et al., 2013]. Отсутствие в современной литературе информации о морффункциональных свойствах тромбоцитов новорожденных в норме и при типовых патологических процессах, таких как гипоксия и воспаление, которые составляют основу практически всех нозологий, определяют необходимость в проведении подобного исследования.

Степень разработанности

Проблеме изучения и классификации морфологических форм тромбоцитов посвящено несколько исследований, в которых сделан акцент на данные, полученные при световой микроскопии фиксированных препаратов [Кенигсон Т.В., 1948; Тоцкая А.А., 1967]. Академик О.К. Гаврилов предложил расширенную классификацию морфологических форм тромбоцитов, основанную на данных, полученных в ходе электронной микроскопии [Гаврилов О.К., 1985]. Несколько позднее, в диссертационном исследовании Ф.В. Коробовой, предложена система для автоматизированной тромбоцитометрии на основе компьютерной морфоденситометрии; ей же определены критерии для комплексной оценки морфологии тромбоцитов, в том числе у детей подросткового возраста [Коробова Ф.В., 2001]. Выполнены исследования, выявившие среди тромбоцитов взрослых лиц, формы с высокой и низкой функциональной активностью при помощи методики витального окрашивания [Макаров М.С., 2013]. Однако, на сегодняшний день нет ни одной работы, касающейся морфологии тромбоцитов у новорожденных детей.

В единичных исследованиях установлены функциональные особенности системы гемостаза у доношенных и недоношенных новорожденных при помощи метода тромбоэластографии, в том числе, при патологии центральной нервной системы [Кузьменко Г.Н. с соавт., 2013; Бережанская С.Б. с соавт., 2014]. Но, комплексного исследования морфофункциональной способности тромбоцитов новорожденных в норме и при типовых патологических процессах, таких как гипоксия и системное воспаление, до настоящего времени не проведено. Теоретические исследования в этом направлении должны стать фундаментальной основой для широкого применения в клинической практике.

Цель исследования

Дать характеристику морфофункционального состояния тромбоцитов новорожденных в норме, после воздействия гипоксии, различной по скорости развития и при синдроме системного воспалительного ответа.

Задачи исследования

1. Провести исследование морфологических классификаций форм тромбоцитов, адаптировать имеющиеся морфологические критерии для возможности выделения основных форм тромбоцитов здоровых новорожденных при изучении на светооптическом уровне.
2. Определить соотношение основных морфологических форм тромбоцитов здоровых новорожденных, дать им характеристику на основе использования микроскопии в режиме светлого поля и трансмиссионной электронной микроскопии.
3. Исследовать функциональную способность тромбоцитов здоровых новорожденных при помощи методики витального окрашивания и метода тромбоэластографии.
4. Исследовать влияние гипоксии (острой, хронической) и синдрома системного воспалительного ответа на морфологию и функциональную способность тромбоцитов новорожденных.

Научная новизна

Выше уже было отмечено, что по разным причинам, тромбоцитам досталось, сравнительно с другими форменными элементами, меньше внимания со стороны исследователей, а в отношении особенностей тромбоцитов новорожденных, системных достоверных сведений, практически нет. В исследовании установлено соотношение основных форм тромбоцитов новорожденных в норме, после перенесенной гипоксии и при синдроме системного воспалительного ответа, дана их характеристика. Выявлена значимая разница в соотношении морфологических форм в норме и при исследованной патологии, как по данным световой, так и по данным электронной микроскопии.

Проведено комплексное исследование функционального состояния тромбоцитов новорожденных в норме и при указанной патологии. Обнаружено наличие субпопуляций тромбоцитов, существенно отличающихся по функциональной способности. Установлена корреляционная взаимосвязь между морфологическим состоянием тромбоцитов новорожденных и их функциональной способностью.

Практическая и теоретическая значимость

Результаты исследования значительно расширяют представления о морфологии и функциональной активности тромбоцитов новорожденных в норме, после воздействия различного генеза гипоксии и синдроме системного воспалительного ответа. Данные об особенностях изменения морфологии и функциональной способности тромбоцитов должны быть использованы при изучении патогенеза рассмотренных процессов.

Выявленные нами моррофункциональные изменения тромбоцитов новорожденных при синдроме системного воспалительного ответа, приводящие к нарушению функционирования системы гемостаза в виде развития геморрагического синдрома, несомненно, должны учитываться врачами неонатологами, гематологами, акушерами-гинекологами и детскими реаниматологами для своевременной диагностики и предотвращения развития данных нарушений.

Полученные данные являются основой для разработки методов ранней диагностики нарушений в функциональной системе тромбоцитарного гемостаза, персонализированного лечения и профилактики осложнений в клинической практике.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Многообразие тромбоцитов периферической крови здоровых новорожденных при изучении их на светооптическом уровне представлено следующими основными формами: неактивными и активированными. Среди неактивных необходимо выделить юные, зрелые и старые формы. Формы тромбоцитов, выявляемые с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, такие как неактивные, переходные и активированные сопоставимы с вышеуказанными.

2. Популяция тромбоцитов новорожденных гетерогенна по составу и представлена формами с различным содержанием гранул. Подавляющее большинство тромбоцитов новорожденных являются функционально полноценными, проявляя адгезивные свойства на стекле. Тромбоциты с малым количеством гранул и без них не способны к адгезии на стекле. Тромбоцитарный гемостаз новорожденных характеризуется гиперкоагуляцией.

3. Типовые патологические процессы, такие как гипоксия и синдром системного воспалительного ответа, оказывают влияние на морфологию тромбоцитов, приводя к характерным изменениям тромбоцитарной формулы. Острая и хроническая гипоксия приводят к уменьшению общего числа тромбоцитов, изменению их процентного соотношения, в виде увеличения количества юных форм. При синдроме системного воспалительного ответа отмечается возрастание количества юных форм с одновременным уменьшением количества зрелых тромбоцитов, с чем связано увеличение показателя среднего объема тромбоцитов. При трансмиссионной электронной микроскопии определяется повышение количества переходных форм и увеличение количества тромбоцитарных микрочастиц.

4. Хроническая гипоксия приводит к изменению морфологии тромбоцитов, без выраженного нарушения их функциональности. Острая гипоксия не вызывает значимых изменений ни в морфологии тромбоцитов, ни в их функциональной активности.

У новорожденных с синдромом системного воспалительного ответа тромбоциты характеризуются сниженной функциональностью и прочностью сгустка, что объясняет высокую частоту развития геморрагических осложнений у данной категории новорожденных.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты научного исследования внедрены в практику работы отделений реанимации и интенсивной терапии новорожденных ГУЗ «Клинический перинатальный центр Саратовской области», ФГАУ «НМИЦ Здоровья детей» Минздрава России г. Москва. Результаты исследований используются при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре морфологии и патологии у студентов 1, 2, 3-х курсов педиатрического и лечебного факультетов ЧУ ОО ВО «Медицинский университет Реавиз».

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: летнем медицинском интернет – форуме-2017 (Саратов, 2017); VII Всероссийской неделе науки с международным участием «Week of Russian science – 2018» (WeRuS-2018) посвященной «Всемирному дню здоровья» (Саратов, 2018); Всероссийском конгрессе «Боткинские чтения», (Санкт-Петербург, 2018); - VIII Межвузовской научно – практической конференции студентов и молодых ученых, (Саратов, 2018); II Международной конференции «Гемостаз, тромбоз и репродукция: междисциплинарный подход», (Санкт-Петербург, 2018); XIV Конгрессе Международной ассоциации морфологов, (Астрахань, 2018).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в которых изложены основные результаты исследования, в том числе 5 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук и 1 монография.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно разработаны методические подходы к реализации поставленной цели и решению задач, выполнены клинические и лабораторные исследования, проведена статистическая обработка и анализ с обобщением полученных результатов, подготовлены к публикации печатные статьи и интернет-сообщения.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, главы с собственными результатами, главы, посвященной обсуждению полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, библиографического списка, состоящего из 33 отечественных и 173 иностранных источников. Работа содержит 11 таблиц и 34 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика клинического материала

Обследовано 110 новорожденных, находящихся на лечении в Клиническом Перинатальном Центре Саратовской области.

Для изучения морфофункциональных свойств тромбоцитов обследованы образцы крови у следующих групп:

1. Доношенные здоровые новорожденные в возрасте до 28 суток — 50 человек.
2. Новорожденные, страдавшие в антенатальном периоде ХВГП – 20 человек.
3. Новорожденные с острой гипоксией (асфиксиею) в родах – 20 человек.
3. Новорожденные, имеющие признаки ССВО— 20 человек.

Критерии исключения из исследования: возраст старше 28 дней, наличие генетически обусловленной патологии системы гемостаза, а также отказ родителей от участия в исследовании.

В 1-ю группу вошли абсолютно здоровые дети, рожденные при сроке гестации 37-42 недели с оценкой по шкале В. Апгар (1952) на первой минуте не менее 7 баллов (Таблица 1).

Во 2-ю группу включались новорожденные с установленным во время беременности матери диагнозом ХВГП. Постановка диагноза основывалась на оценке маточно – плацентарно – плодового кровотока при помощи ультразвуковой доплерометрии и цветового допплеровского картирования, выполненных во время беременности. В 3-ю группу вошли новорожденные, у которых не отмечено нарушений кровотока и развития в антенатальном периоде, но имелся эпизод острой интранатальной гипоксии (асфиксии),

подтвержденный с помощью кардиотокографии и оценки после рождения по общепринятой шкале В. Апгар. В 4-ю группу – новорожденные, имеющие признаки ССВО, подтвержденные клинико-лабораторными данными, согласно Национальным рекомендациям [Антонов А.Г. и др., 2009]. Кроме того, данная группа новорожденных характеризовалась проявлениями геморрагического синдрома в виде желудочно-кишечного, легочного кровотечения и внутрижелудочковыми кровоизлияниями различной степени.

Таблица 1.

Характеристика групп исследуемых пациентов

Критерий	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	Здоровые (n=50)	ХВГП (n=20)	Асфиксия (n=20)	ССВО (n=20)
Возраст (сут.)	1	2,7 ± 1,27	1,5 ± 0,67	10,3 ± 5,4
Масса при рождении (г)	3441 ± 419	1986 ± 767	2783 ± 1131	1487 ± 837
Срок гестации (недели)	39,6 ± 2,6	33,8 ± 3,5	34,9 ± 3,49	31,8 ± 3,055
Оценка Апгар на 1-ой мин (баллы)	8 ± 0,7	2,9 ± 1,5	1,6 ± 0,66	3,5 ± 1,9

Методология и методы исследования

Взятие венозной крови осуществляли в соответствии с рекомендациями международного комитета по стандартизации в гематологии (ICSH) стандартным способом венепункции в вакуумную пробирку, содержащую стандартное количество распыленного ЭДТА К₃ (калиевая соль этилендиаминететрауксусной кислоты). Одновременно осуществляли взятие крови в пробирки с 3,2 % цитрата натрия для дальнейшего исследования на тромбоэластографе.

Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали на центрифуге LMC-3000 (Biosan SIA, Латвия) в течение 5 минут при скорости 1200 оборотов в минуту, затем отбирали надосадок. В течение часа изготавливали мазки по общепринятой методике, высушивали на воздухе. Далее фиксировали в растворе фиксатора – красителя Май – Грюнвальда 5 минут с последующим докрашиванием по Романовскому в течение 5 минут. После чего мазки высушивались для дальнейшего микроскопирования.

Для витального окрашивания тромбоцитов использовали смесь флуорохромов – трипафлавина и акридинового оранжевого по методике, предложенной М.С. Макаровым (2013).

Подсчет количества тромбоцитов (PLT, %) с определением среднего объема тромбоцитов (MPV, фл), ширины распределения тромбоцитов по объему (PDW, %), тромбокрита (PCT, %) производили на проточном гематологическом анализаторе Mindray BC-3000 Plus (Mindray, Китай).

Измерение параметров тромбоэластограммы (ТЭГ) проводили на тромбоэластографе TEG-5000 (Haemoscope Corporation, США). Исследования

выполнены после рекальцификации цельной крови 0,2М раствором хлорида кальция (20 мкл CaCl₂ и 340 мкл цитратной крови). Учитывались два показателя — максимальная амплитуда (MA) и прочность сгустка (G), характеризующие функциональную способность тромбоцитов [Craft R.M., 2004; Ferrer Marin F. et al., 2011].

Микроскопирование проводили на базе ИБФРМ РАН в центре коллективного пользования «Симбиоз» (руководитель к.б.н., старший научный сотрудник А.А. Широков). Препараты визуализировали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000 B (Leica - microsystems, Германия) в режимах светлого поля (масляная иммерсия) и флуоресценции (фильтр I3, возбуждение 450-490 нм) конденсор 0,90/1,25, объектив Planachronat 100/1,25. Электронно – микроскопическая визуализация ультраструктуры тромбоцитов выполнялась на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия), при напряжении 120 кВ, диапазон увеличений – 2500-10000х.

Фотографирование производили с помощью цифровой камеры Leica DFC300 FX, разрешение – 1.4 мегапикселя, максимальная скорость съемки 60 кадров/с. Морфометрические показатели получали при обработке цифровых фотографий с помощью специальной программы для морфометрического и структурного анализа изображений ImageJ 1.50 i (National Institutes of Health, США).

Статистический анализ результатов обследования пациентов проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 for Windows корпорации StatSoft-Russia, GraphPad Prism 6 for Windows корпорации GraphPad Software, США, Microsoft Office Exelle 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение любого предмета необходимо начинать с рассмотрения существующих определений и классификаций. Поскольку в доступной литературе нами найдено достаточно небольшое количество исследований по тромбоцитам, мы рассмотрели и проанализировали все классификации, предлагаемые авторами. При всех положительных чертах они оказались малоприменимы на практике, так как не соответствуют формально – логическим принципам, предъявляемым к классификациям, именно поэтому мы предприняли попытку систематизации имеющихся «разрозненных» данных.

Руководствуясь единым принципом классификации, что все причинно – условно и развивается в пространстве и времени, на основе опыта предшествующих исследователей, используя результаты собственных исследований, для удобства мы предлагаем систематизировать имеющиеся данные о морфологии тромбоцитов следующим образом:

- по причине изменения морфологии (гипоксия/ воспаление/ др. физико – химические факторы);
- по размеру (1-1,9 мкм; 2-2,9 мкм; 3-3,9 мкм; 4-5 мкм; выше 5 мкм (гигантские));

- по времени (степени созревания) – (формы с преобладанием гиаломера/формы, в которых грануломер и гиаломер выражены одинаково/формы с преобладанием грануломера);
- по наличию отростков (тромбоциты, не содержащие отростков/ тромбоциты, содержащие отростки: короткие пальцеобразные или выраженные длинные отростки).

Исходя из сочетания различных признаков, становится возможным выделение основных морфологических форм тромбоцитов, которые составляют основу тромбоцитарной формулы при изучении на светооптическом уровне.

Для того чтобы отнести каждый тромбоцит к той или иной форме, в соответствии с выбранной классификацией, необходимо иметь четкие определяющие критерии. В первую очередь, существуют клетки округлой формы с четко дифференцированным грануломером, среди них можно выделить, как минимум три субпопуляции. Это более крупные формы – юные, средние по размеру – зрелые и самые мелкие формы – старые, все они относятся к формам «покоя». Кроме описанных выше, существуют клетки неправильной формы, в которых не дифференцируется грануломер, и присутствуют выраженные длинные отростки, данные формы представляют собой активированные тромбоциты (Рис. 1).

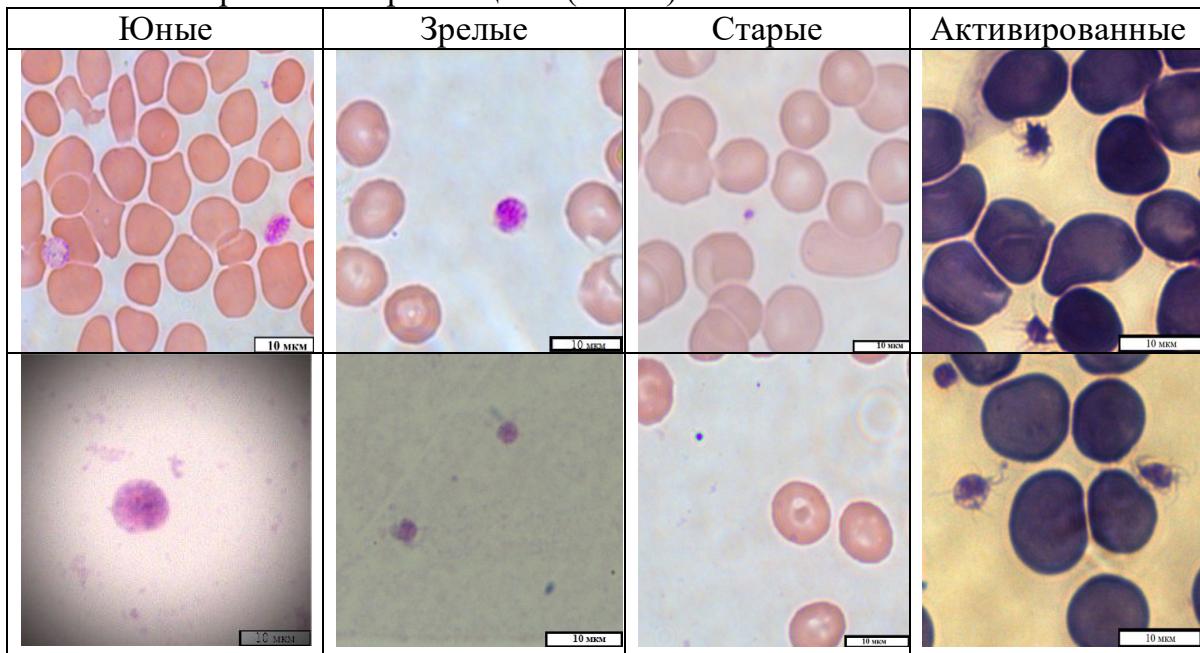


Рис. 1 – Морфологические формы тромбоцитов новорожденных, режим светлого поля, окраска по Май – Грюнвальд – Романовскому, увеличение х1000

Приведем характеристику каждой из упомянутых форм тромбоцитов в соответствии с полученными данными. Юные формы представляют собой тромбоциты, размером в среднем от 3 до 5,5 мкм в диаметре, округлой или овальной формы, в которых гиаломер занимает большую часть клетки, грануломер представлен отдельными гранулами. Равномерно распределенный по всей площади тромбоцита грануломер окрашивался в сиреневый цвет. Зрелые тромбоциты – округлой или полигональной формы, размером от 1 до 3

мкм в диаметре, грануломер и гиаломер занимают примерно одинаковый объем, грануломер представлен негомогенной зернистой массой, реже – отдельно лежащими гранулами. В небольшом проценте случаев у данных тромбоцитов визуализируются короткие «пальцеобразные» отростки (менее 4 мкм), что может рассматриваться как начальная стадия активации тромбоцита. Старые формы – размером от 0,4 до 1 мкм, чаще округлой формы, в которых не различим гиаломер, а весь объем занимает интенсивно окрашенный в темно-фиолетовый цвет грануломер. Активированные тромбоциты различаются по размеру – от 3,5 до 6,7 мкм в диаметре, они округлой или неправильной формы, с выраженным отростками длиной более 4 мкм. Гиаломер выглядит светлым с единичными гранулами, как правило, смещенными к периферии клетки, либо вообще без них. В ряде случаев присутствуют вакуоли.

При подсчете тромбоцитарной формулы получены следующие значения: юные формы – 2 (1-2) %, зрелые – 76 (73-80) %, старые – 5 (4-7,5) %, активированные – 17 (13-19,5) %. Наряду с изучением морфологии тромбоцитов, проанализированы основные тромбоцитарные показатели, такие как средний объем тромбоцитов (MPV), дисперсия распределения по объему (PDW) и тромбокрит (PCT), (Таблица 2). Эти показатели, по мнению многих авторов [Kapsoritakis A. N. et al., 2001; Endler G. et al., 2002; Bath P. et al., 2004; Bilici S. et al., 2011; Tekbas E. et al., 2012; Cho S.Y. et al., 2013;], отражают морфофункциональное состояние тромбоцитов.

Таблица 2.

Тромбоцитарные показатели здоровых новорожденных

Показатель	PLT, тыс.	MPV, фл	PDW, %	PCT, %
Ме	281,5	5,7	19,15	0,16
LQ-UQ	246-340	5,0-7,25	18,55-19,9	0,14-0,21

Примечание: Ме – медиана; LQ – нижний quartиль; UQ – верхний quartиль

Для определения функциональной способности тромбоцитов здоровых новорожденных использовалась методика витального окрашивания [Макаров М.С., 2013]. Данное окрашивание во флуоресцентном микроскопе вызывает красное свечение гранул и зеленое свечение цитоплазмы. При выполнении микроскопии оценивали два параметра – относительное содержание тромбоцитов с гранулами, выраженное в процентах от общего количества анализированных клеток и адгезивную активность тромбоцитов (ААТ) на стекле. ААТ оценивали также с помощью методики, предложенной Макаровым М.С. (2013). Для этого препарат с прижизненно окрашенными тромбоцитами на стекле помещали на 15 минут в термостат при температуре 37⁰С, а затем при помощи флуоресцентного микроскопа определяли количество адгезировавших тромбоцитов в расчете на 100 анализируемых форменных элементов. Адгезировавшие тромбоциты при этом выглядят как большие распластанные клетки округлой формы, в которых гранулы либо оттеснены к периферии, либо выходят за пределы клетки. Адгезивную активность выражали в процентах от общего числа проанализированных клеток.

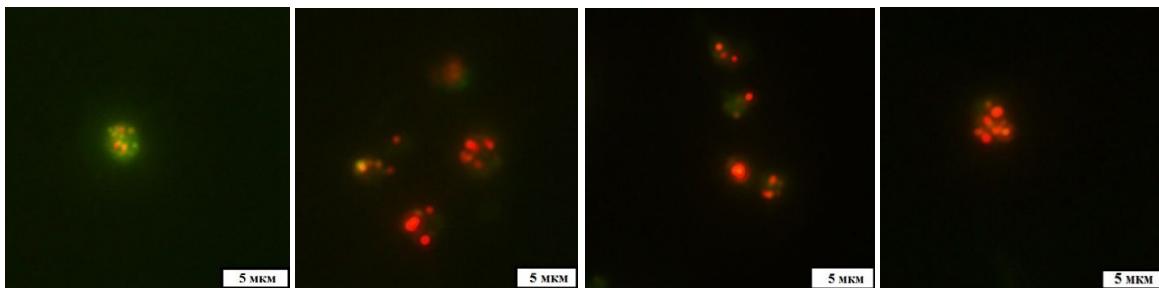


Рис. 2 – Популяция тромбоцитов здоровых новорожденных. Окраска акридиновый – оранжевый - трипафлавин, режим флуоресценции, увеличение х1000

Установлено, что популяция тромбоцитов новорожденных гетерогенна по составу и представлена формами с различным содержанием гранул вплоть до их отсутствия (Рис. 2). Нами выделены следующие классы: тромбоциты с большим количеством гранул (содержащие от 10 до 13 отчетливых гранул), их количество составило 40 (34-42) %, тромбоциты с средним количеством гранул (содержащие 4-9 гранул) – 45 (43-46) %, тромбоциты с низким количеством гранул (содержащие 1-3 гранулы) – 10 (8-11) % и тромбоциты без гранул, которые составили 5 (4-7) % от общего количества.

При изучении адгезивных свойств выявлено несколько различных форм тромбоцитов, по-видимому, отражающих кинетику активации во времени (Рис. 3).

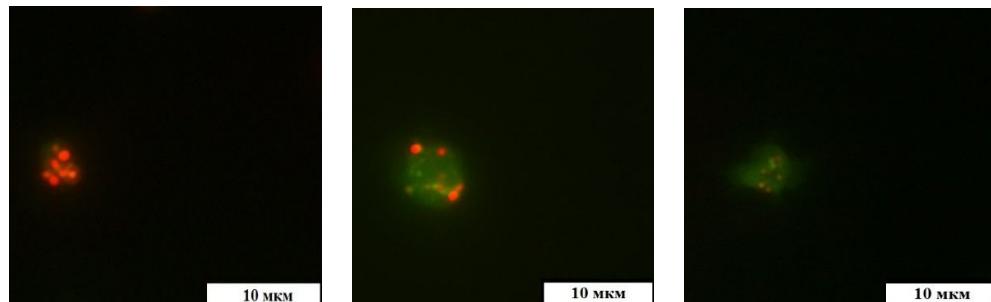


Рис. 3 – Процесс активации тромбоцита во времени. Окраска акридиновый – оранжевый - трипафлавин, режим флуоресценции, увеличение х1000

Примечание: слева направо представлены микрофотографии тромбоцитов с большим количеством гранул, с оттесненными к периферии клетки гранулами и с отсутствием гранул и измененной формой.

Подавляющее большинство проанализированных тромбоцитов функционально полноценны и проявляли адгезивные свойства – 72 (64-78) %, меньшая часть – 28 (21-31) % представляет собой не адгезировавшие форменные элементы (Рис. 4). Тромбоциты с малым количеством гранул и без них, не обладали адгезивными свойствами, являясь ареактивными.

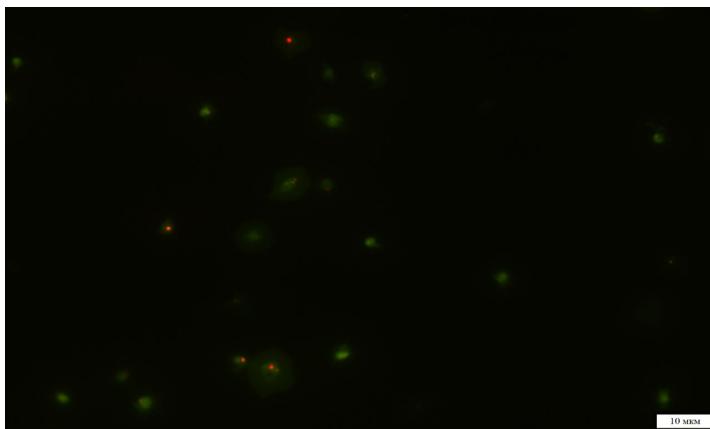


Рис. 4 – Адгезия тромбоцитов на стекле. Окраска акридиновый – оранжевый - трипафлавин, режим флуоресценции, увеличение х1000

Одновременно проводили исследования на тромбоэластографе, изучая при этом показатели, которые имеют прямое отношение к тромбоцитарному гемостазу. Согласно мнению большинства исследователей, такими показателями являются максимальная амплитуда (МА) и прочность (G) [Craft R.M., 2004; Ferrer-Marin F. et al., 2011]. МА — показатель, отражающий максимум динамических свойств соединения фибрина и тромбоцитов, измеряется в миллиметрах (мм). По литературным данным, на 80 % данный показатель обусловлен количеством и способностью тромбоцитов к агрегации, а на 20 % количеством образовавшегося фибрина. Прочность сгустка напрямую зависит от функциональной полноценности тромбоцитов, измеряется в дин/см² (d/sc).

Показатель максимальной амплитуды в исследовании составил 60 (50-62,7) мм, а прочность – 7,7 (7,45-8,4) дин/см², что согласуется с результатами ранее проведенных исследований. ТЭГ здорового новорожденного представлена на Рис. 5.

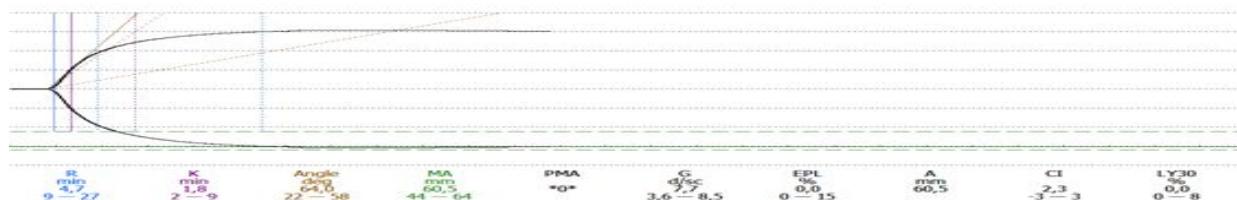


Рис. 5 – Тромбоэластограмма здорового новорожденного

Для изучения влияния типовых патологических процессов на морфологию тромбоцитов, нами были выделены три группы новорожденных:

Группа 2: новорожденные, страдавшие в антенатальном периоде ХВГП (n=20).

Группа 3: новорожденные с острой гипоксией (асфиксиею) в родах (n=20).

Группа 4: новорожденные, имеющие признаки ССВО (n=20).

Группу контроля (1) составили здоровые доношенные новорожденные (n=50), результат исследования которых представлен выше.

В группе новорожденных с ХВГП количество юных форм составило 4 (3-5,25) %, зрелых – 72,5 (69,75-77,25) %, старых – 5 (3,7-6,0) %, активированных

– 16,5 (14,5-22) %. Количество юных форм достоверно выше, чем в контрольной группе ($p \leq 0,0008$), по остальным формам тромбоцитов статистически значимых различий не выявлено.

В группе новорожденных, перенесших острую гипоксию (асфиксию), формы тромбоцитов распределились следующим образом: юные – 3,5 (2-4) %, зрелые – 73,5 (71-78,25) %, старые – 5 (4,75-7,5) %, активированные – 17 (11-20,25) %. По отношению к контрольной группе отмечено достоверно значимое увеличение юных форм ($p \leq 0,0317$). Результаты исследования тромбоцитарных показателей в различных группах приведены в Таблице 3.

Таблица 3.

Результаты исследования морфологии тромбоцитов новорожденных с перенесенной гипоксией и ССВО на гематологическом анализаторе

Показатель	Кол-во тромбоцитов (тыс./мкл)	Средний объем тромбоцитов (фл)	Дисперсия распределения по объему (%)	Тромбокрит (%)
Группа				
Группа 2 n=20	156* 124-238	8,3* 7,1-9,0	16,75* 15,98-17,65	0,136 0,069-0,215
Группа 3 n=20	186,5* 117,3-245	7,45 6,57-8,72	18,4 17,3-19,1	0,155 0,060-0,1725
Группа 4 n=20	49,5* 24-69	10,05* 8,5-11,25	18,45 17,03-19,53	0,053* 0,022-0,068
Контрольная группа (1) n=50	281,5 245-340	5,7 5,0-7,22	19,15 18,35-19,9	0,16 0,14-0,2163

Примечание: для всех параметров указаны медианы и интерквартильный размах.

* $p \leq 0,05$ – критерий достоверности различий Краскела – Уоллиса по отношению к контрольной группе с поправкой Данна для множественных сравнений.

У новорожденных с ССВО тромбоцитарная формула имеет следующий вид: юные – 14 (11,5-16,5) %, зрелые – 62 (58-68) %, старые – 6 (5-8) %, активированные – 17 (13,5-22) %. Количество юных форм достоверно превышает значения, полученные в контрольной группе ($p \leq 0,0001$), одновременно наблюдается статистически значимое уменьшение количества зрелых тромбоцитов ($p \leq 0,0001$), что может свидетельствовать об интенсификации тромбоцитопоэза с одной стороны и усиении деструкции тромбоцитов с другой. В результате воздействия ССВО на тромбоциты происходит не только сдвиг тромбоцитарной формулы в сторону юных форм, но и статистически значимое увеличение размеров юных и зрелых форм тромбоцитов, вероятнее всего, это объясняется ускоренным созреванием тромбоцитов, вследствие избыточного количества ТПО и попаданием в кровоток не до конца зрелых тромбопластинок, имеющих больший размер. На

Рис. 6 для наглядности приведены значения тромбоцитарной формулы всех исследованных групп.

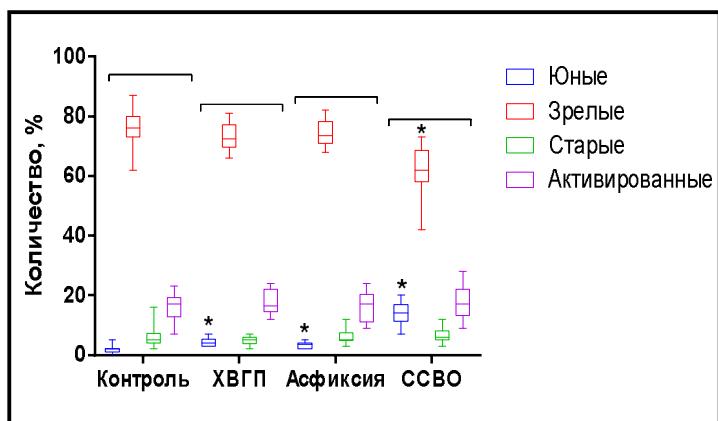


Рис. 6 – Тромбоцитарная формула исследованных групп

Примечание: * $p \leq 0,05$ – критерий достоверности различий Краскела – Уоллиса по отношению к контрольной группе с поправкой Данна для множественных сравнений.

При исследовании тромбоцитов новорожденных, подвергшихся влиянию хронической гипоксии с помощью методики витального окрашивания обнаружено уменьшение содержания тромбоцитов с большим количеством гранул и возрастание содержания тромбоцитов с малым количеством гранул и с отсутствием таковых. При острой гипоксии (асфиксии), содержание гранул в тромбоцитах также снижается, большинство клеток – тромбоциты, содержащие 5-6 гранул.

У новорожденных с признаками ССВО отмечено значительное снижение функциональной активности. Приоритетными являлись тромбоциты, не содержащие гранул и с 2-3 гранулами, не проявлявшие адгезивных свойств (Рис. 7).



Рис. 7 – Тромбоциты новорожденного с ССВО. Окраска акридиновый – оранжевый - трипафлавин, режим флуоресценции, увеличение $\times 1000$

Примечание: хорошо различимы единичные гранулы в тромбоцитах, которые имеют заметно меньшую яркость свечения гранул по сравнению с тромбоцитами других групп, что, вероятнее всего объясняет сниженную функциональную активность.

Таким образом, тромбоциты новорожденных, перенесших ХВГП характеризуются умеренным снижением адгезивной активности, в то время как при воздействии острой гипоксии не происходит значимого изменения ни в

морфологии тромбоцитов, ни в их функциональной активности. Популяция тромбоцитов новорожденных с признаками ССВО представлена формами, не содержащими гранул или с единичными гранулами, которые являлись функционально интактными и не проявляли адгезивных свойств на стекле (Таблица 4).

Таблица 4.

Показатели функциональной полноценности тромбоцитов, полученные с помощью методики витального окрашивания

Числовые показатели гранул в тромбоцитах (%)	Группа 2 n=20	Группа 3 n=20	Группа 4 n=20	Контрольная группа 1 n=50
	Ме LQ–UQ	Ме LQ–UQ	Ме LQ–UQ	Ме LQ–UQ
Большое количество	28* 26-35	37 36-40	8* 5-9	40 34-42
Среднее количество	40 33-42	43 40-44	22* 20-22	45 43-46
Малое количество	16* 13-19	12,2 9-12	30* 27-34	10 8-11
Без гранул	16* 12-17	8 7-10	40* 37-45	5 4-7
AAT, %	56 52-60	68 60-70	20* 14-24	72 64-78

Примечание: для всех параметров указаны медианы и интерквартильный размах.

Изменение качественного и количественного состава тромбоцитов при воздействии гипоксии и ССВО, несомненно, должно отразиться на их функциональной способности. Из рис. 8 видно, что в группе новорожденных, перенесших ХВГП, показатель МА ниже, чем в группе здоровых новорожденных, однако различие статистически не достоверно ($p > 0,05$); напротив, показатель G в этой группе достоверно ниже такового в контрольной группе ($p < 0,001$). Если принять во внимание тот факт, что количество тромбоцитов в этой группе снижено по отношению к контрольной, то говорить с уверенностью о том, что снижение показателя прочности связано только с качественными изменениями тромбоцитов, нельзя. В данном случае, скорее всего, имеет место совокупное снижение количества и функциональной активности тромбоцитов.

В группе новорожденных, перенесших острую гипоксию (асфиксию), показатели МА и G практически не отличается от таковых в группе здоровых новорожденных ($p > 0,05$), что, вероятнее всего, объясняется кратковременностью воздействия патологического фактора.

В группе новорожденных с ССВО отмечено статистически значимое снижение показателей МА и G ($p < 0,0001$), что может свидетельствовать как о количественной недостаче тромбоцитов, так и о снижении их функциональной активности. Дифференцировать причину не представляется возможным, так как во всех изученных случаях наблюдалась тромбоцитопения.

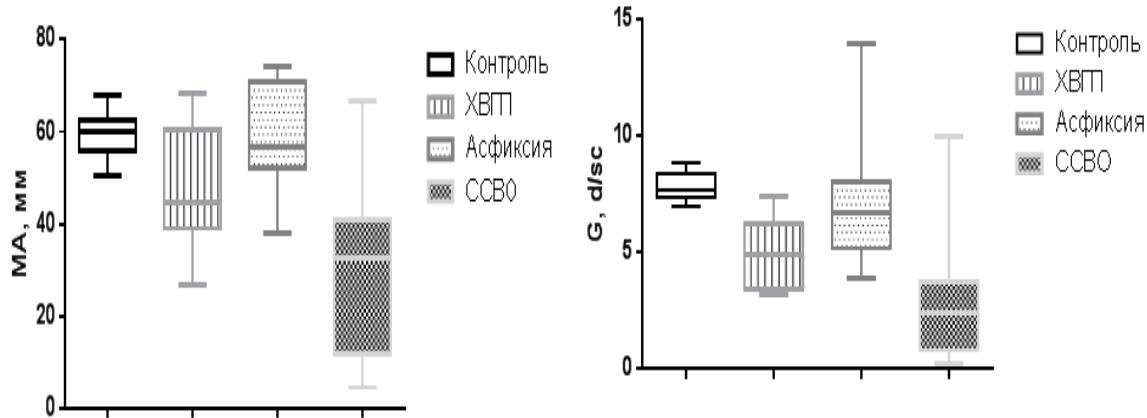


Рис. 8. Показатели максимальной амплитуды (МА) и прочности (G) в разных группах

При выполнении трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и анализе полученных изображений мы столкнулись с невозможностью применения, использованной ранее классификации. Сложность заключалась в том, что при ТЭМ невозможно разделить неактивные формы по признаку соотношения гиаломера и грануломера, возможна лишь ориентация на размер клетки. Кроме того, выяснилось, что описанные Т.В. Кенигсон вакуолизированные формы все же существуют, но визуализировать их можно только при электронной микроскопии. Эти тромбоциты, по – видимому, представляют собой формы, находящиеся на начальных этапах активации, когда происходит расширение элементов ОКС, что приводит к появлению вакуолей, но еще нет выраженной перестройки цитоскелета и, соответственно, изменения формы. Таким образом, для описания морфологии тромбоцитов новорожденных при данном исследовании, нам необходимо новое основание деления. Для удобства описания и понимания, все исследованные тромбоциты разделены на три формы: неактивные, переходные и активированные.

Неактивные тромбоциты здоровых новорожденных при выполнении ТЭМ выглядели как образования округлой или дисковидной формы, со средними размерами 2-3 мкм. В большинстве изученных препаратов удавалось рассмотреть многочисленные α -гранулы, их размер составлял 300-500 нм. Плотные β -гранулы встречались несколько реже, их средний размер 200-350 нм. Именно эти гранулы накапливают акридиновый оранжевый, так как являются кислотными по своей природе. Кроме того, встречались образования, схожие по плотности с β -гранулами, однако меньшего размера, порядка 100-200 нм, которые были отнесены к γ -гранулам. В некоторых препаратах удавалось различить лизосомы и микропероксисомы, представленные в виде гранул, а также единичные митохондрии (Рис. 9).

Гранулы гликогена были либо диффузно «рассыпаны» по всей площади тромбоцита, либо концентрировались в небольшие скопления. Отдельного внимания заслуживает ОКС, которая представлена вакуолями разнообразного размера и извитыми каналцами, которые чаще всего, имеют контакт с цитолеммой тромбоцита. В данных формах тромбоцитов вакуоли и элементы ОКС выражены не отчетливо.

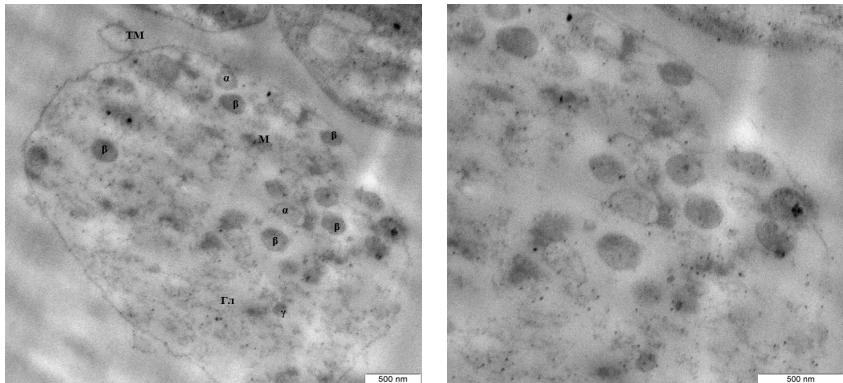


Рис. 9 – Неактивный тромбоцит новорожденного

Микрофотография тромбоцита, выполненная с помощью ТЭМ, x10000 (слева), тот же тромбоцит в увеличенном виде (справа). Заметны многочисленные α -гранулы, β -гранулы, γ -гранулы, гранулы гликогена (Гл), диффузно расположенные по всей площади тромбоцита; а также малочисленные митохондрии (М) в верхнем углу представлена тромбоцитарная микрочастица (ТМ).

Переходные формы тромбоцитов не значительно отличались от неактивных по морфометрическим характеристикам, имели примерно одинаковые линейные размеры и площадь поверхности. Отличительной особенностью данных форм, как уже говорилось выше, является наличие расширенных элементов ОКС – вакуолей. Среди гранул выявляются, как правило малочисленные α -гранулы, обычно смещенные к периферической части, β -гранулы, в большинстве случаев, отсутствуют. Гликоген в таких тромбоцитах, в отличие от неактивных, не был диффузно расположен по всей площади, а концентрировался в «глыбки».

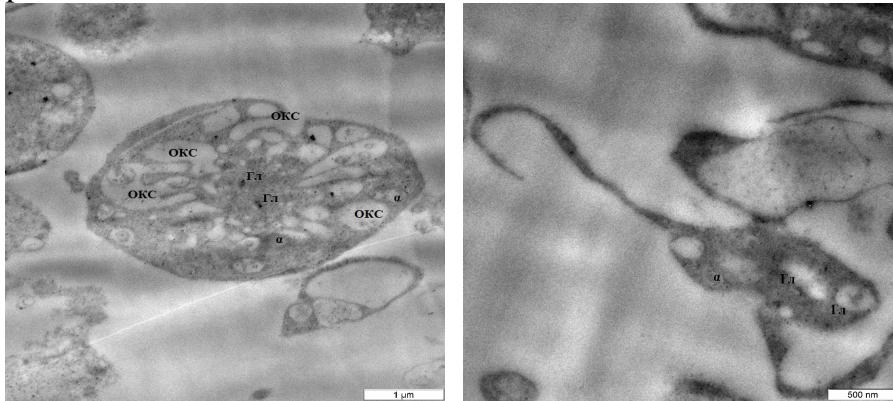


Рис. 10 – Переходная и активированная формы тромбоцитов новорожденных

Микрофотография препарата тромбоцитов здоровых новорожденных, выполненная с помощью ТЭМ, x10000.

Примечание: на рисунке слева представлена переходная форма тромбоцита, заметна хороша развитая ОКС, имеющая контакт с наружной поверхностью цитолеммы, многочисленные

вакуоли, единичные α -гранулы, смешенные к периферической части клетки, гликоген (Гл), расположенный глыбками; справа представлен активированный тромбоцит, имеющий длинные ветвящиеся отростки, сохранены единичные не дифференцируемые гранулы, скопления глыбок гликогена.

Активированные формы были с выраженными морфологическими изменениями. В результате реорганизации цитоскелета тромбоциты принимают неправильную форму и появляются разнообразной длины отростки. Все виды гранул обычно отсутствуют, либо присутствуют единичные α -гранулы, гликоген представлен отдельными глыбками (Рис. 10).

При подсчете основных форм тромбоцитов при ТЭМ, выявлена статистически значимая разница в количестве неактивных и переходных форм в группе новорожденных с ССВО по отношению к контрольной группе. Отмечено достоверное увеличение количества переходных форм до 16,5 (14,5-20,5) % против – 3 (2-4) % в контрольной ($p < 0,0001$) с одновременным уменьшением количества неактивных тромбоцитов до 67 (62,5-71) % по сравнению с контрольной группой – 82 (80-85) % ($p < 0,0001$); по остальным группам различий по содержанию тех или иных форм не получено.

При проведении электронной микроскопии мы встретили большое количество разнообразных, так называемых, тромбоцитарных микрочастиц (ТМ). Они гетерогенны как по размеру, так и по строению и могут быть представлены простыми пузырьками, без внутреннего содержимого, а могут иметь секреторные гранулы, с помощью которых передается «сигнальная информация» для других тромбоцитов и клеток эндотелия.

Наряду с подсчетом основных форм тромбоцитов при ТЭМ, мы проанализировали количество ТМ на 100 тромбоцитов в каждой исследованной группе. Выявлено, что в группах новорожденных с острой гипоксией и ХВГП, количество ТМ на 100 тромбоцитов превышает значения, полученные в группе здоровых новорожденных, однако эти различия статистически не достоверны ($p > 0,05$); напротив, в группе ССВО количество ТМ на 100 тромбоцитов практически втрое превышает такое в группе здоровых новорожденных – 32 (27-36) % против 12 (9-14) % ($p < 0,0001$). На рис. 11 представлены переходные формы тромбоцитов новорожденных из группы ССВО.

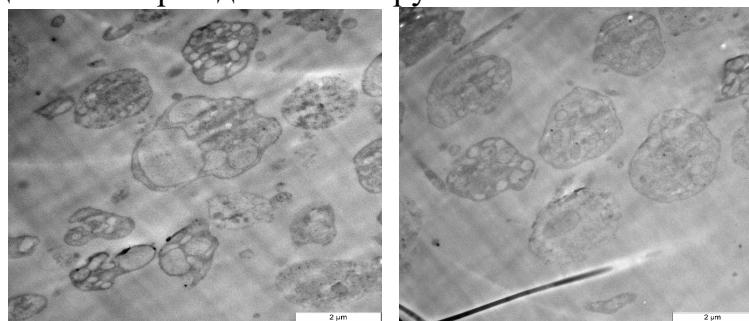


Рис. 11 – Тромбоциты новорожденного с ССВО

Микрофотографии препаратов тромбоцитов новорожденных с ССВО, выполненные с помощью ТЭМ, х10000.

Примечание: на рисунках представлены переходные формы тромбоцитов, заметны многочисленные вакуоли и полное или практически полное отсутствие гранул.

ВЫВОДЫ

1. Проведена адаптация имеющихся морфологических критериев, которые позволяют определить среди популяции тромбоцитов новорожденных при исследовании на светооптическом уровне следующие формы: неактивные и активированные; среди неактивных следует различать юные, зрелые и старые формы.
2. Тромбоцитарная формула новорожденных, изученная на светооптическом уровне представлена следующим образом: юные – 2 (1-2) %, зрелые – 76 (73-80) %, старые – 5 (4-7,5) % и активированные – 17 (13-19,5) %. Формы тромбоцитов, выявляемые с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, такие как неактивные, переходные и активированные сопоставимы с вышеуказанными и составляют 82 (80-85) %, 3 (2-4) %, 15 (13-17) % соответственно.
3. При витальном окрашивании тромбоцитов здоровых новорожденных выявляется их неоднородность, связанная с различным содержанием гранул. Выделены следующие классы: тромбоциты с большим количеством гранул (содержащие от 10 до 13 отчетливых гранул), их количество составило 40 (34-42) %, тромбоциты с средним количеством гранул (содержащие 4-9 гранул) – 45 (43-46) %, тромбоциты с низким количеством гранул (содержащие 1-3 гранулы) – 10 (8-11) % и тромбоциты без гранул, которые составили 5 (4-7) % от общего количества. Тромбоциты с небольшим количеством гранул и без них не обладают адгезивными свойствами. Большинство тромбоцитов являются функционально полноценными, проявляя адгезивные свойства в 86 (70-94) %, меньшая часть – 14 (9-16) % не проявляет адгезивных свойств. Данные, полученные в ходе проведения тромбоэластографии, подтверждают, что тромбоцитарный гемостаз новорожденных характеризуется гиперкоагуляцией ($MA=60$ мм, $G=7,7$ дин/ cm^2).
4. Хроническая гипоксия у новорожденных приводит к уменьшению общего числа тромбоцитов до 156 (124-238) тыс. в мкл., увеличению показателя MPV до 8,3 (7,1-9,0) фл, снижению показателя PDW до 16,75 (15,98-17,65) %, изменению их процентного соотношения в виде увеличения количества юных форм относительно группы здоровых новорожденных: юные – 4 (3-5,25) %, зрелые – 72,5 (69,75-77,25) %, старые – 5 (3,7-6,0) %, активированные – 16,5 (14,5-22) %. По данным тромбоэластографии, в данной группе имеет место снижение показателя прочности сгустка до 4,9 (3,45-6,25) дин/ cm^2 , по данным методики витального окрашивания отмечается снижение тромбоцитов с большим количеством гранул до 28 (26-35) %, повышение содержания тромбоцитов с малым количеством гранул – 16 (13-19) % и тромбоцитов без гранул – 16 (12-17) %, адгезивная активность не изменена.
5. Количество тромбоцитов в группе новорожденных с острой гипоксией снижено относительно группы контроля 186,5 (117,3-245) тыс. в мкл., тромбоцитарная формула характеризуется статистически значимым увеличением юных форм и выглядит следующим образом: юные – 3,5 (2-4) %,

зрелые – 73,5 (71-78,25) %, старые – 5 (4,75-7,5) %, активированные – 17 (11-20,25) %. По данным тромбоэластографии статистически значимых изменений не получено: показатель G – 6,7 (5,2-8,025) дин/см², показатель MA – 56,6 (52-70,83) мм, по результатам витального окрашивания значимых различий также нет.

6. При наличии признаков синдрома системного воспалительного ответа у новорожденных количество тромбоцитов резко снижено – 49,5 (24-69) тыс. в мкл, количество юных форм достоверно превышает значения, полученные в контрольной группе: юные – 14 (11,5-16,5) %, зрелые – 62 (58-68) %, старые – 6 (5-8) % активированные – 17 (13,5-22) %, одновременно наблюдается статистически значимое уменьшение количества зрелых тромбоцитов. При трансмиссионной электронной микроскопии установлено увеличение количества переходных форм до 16,5 (14,5-20,5) %, уменьшение количества неактивных форм до 67 (62,5-71) % и увеличение количества тромбоцитарных микрочастиц по сравнению с другими группами – 32 (27-36) на 100 тромбоцитов.

У новорожденных с синдромом системного воспалительного ответа тромбоциты характеризуются сниженной функциональностью и прочностью сгустка по данным тромбоэластографии: показатель MA – 32,5 (11,98-40,75) мм., показатель G – 2,45 (0,825-3,725) дин/см² а также сниженной адгезивной активностью, определенной с помощью методики витального окрашивания: резко снижено содержание тромбоцитов с большим и средним количеством гранул – 8 (5-9) % и 20 (20-22) % соответственно, повышенено содержание тромбоцитов с малым количеством гранул – 30 (27-34) % и с отсутствием таковых – 40 (37-45) %. Отмечается значимое снижение адгезивной активности до 20 (14-24) %.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Своевременная диагностика нарушений в системе тромбоцитарного гемостаза в клинической практике требует не только количественного определения уровня тромбоцитов, но и подсчет тромбоцитарной формулы, по изменениям которой можно судить о соотношении производства и потребления тромбоцитов.
2. Внедрение в широкую клиническую практику определения общедоступных тромбоцитарных показателей, для которых определен эталон нормы, позволит повысить качество диагностики патологических состояний у новорожденных. Повышение показателя среднего объема тромбоцитов (MPV) более чем до 8 фл на фоне снижения общего количества тромбоцитов свидетельствует об увеличении количества юных форм, вследствие интенсификации тромбоцитопоэза на фоне усиленной деструкции тромбоцитов.
3. Снижение у новорожденных общего количества тромбоцитов ниже 100 тыс. на мкл. и уменьшение их функциональной активности по данным трансмиссионной электронной микроскопии, исследования адгезивной активности и тромбоэластографии, является дополнительным критерием

формирования синдрома системного воспалительного ответа. В данной популяции увеличивается риск развития кровотечений, что необходимо учитывать при определении тактики лечения таких пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Леонтьев, М.А. Морфология тромбоцитов новорожденных : обзор литературы / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская, В.В. Масляков // Вестник медицинского института РЕАВИЗ (РЕАБИЛИТАЦИЯ, ВРАЧ И ЗДОРОВЬЕ). – 2017. – № 6 (30). – С. 75-82.
2. Леонтьев, М.А. Изменение тромбоцитарных индексов и числа тромбоцитов у новорожденных с тяжелым комбинированным иммунодефицитом / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская, Т.П. Романова и др. // Вестник медицинского института РЕАВИЗ (РЕАБИЛИТАЦИЯ, ВРАЧ И ЗДОРОВЬЕ). – 2017. – № 4 (28). – С. 40-44.
3. Леонтьев, М.А. Формально – логическое исследование классификаций форм тромбоцитов / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская, И.С. Аристова и др. // Вестник медицинского института РЕАВИЗ (РЕАБИЛИТАЦИЯ, ВРАЧ И ЗДОРОВЬЕ). – 2018. – № 2 (32). – С. 45-48.
4. Леонтьев, М.А. Морфофункциональная характеристика тромбоцитов новорожденных / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская, А.В. Леонтьева // Педиатрия. – 2018. – № 97 (4). – С. 66-70.
5. Леонтьев, М.А. Изучение морфофункциональных свойств тромбоцитов новорожденных в норме, при гипоксии и синдроме системного воспалительного ответа с использованием витального окрашивания / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская, Т.Е. Пылаев и др. // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2018. – № 4. – С. 30-39.
6. Леонтьев, М.А. Морфологическая характеристика тромбоцитов новорожденных с синдромом системного воспалительного ответа / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская // Тезисы VII Всероссийской недели науки с международным участием «Week of Russian science – 2018» (WeRuS-2018) посвященной «Всемирному дню здоровья». Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2018. – Т. 8. – № 5. – С. 183.
7. Леонтьев, М.А. Функциональные особенности тромбоцитарного гемостаза новорожденных / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская // Тезисы II Международной конференции «Гемостаз, тромбоз и репродукция: междисциплинарный подход». – 2018. – С. 12.
8. Леонтьев, М.А. Тромбоцитарные индексы здоровых новорожденных / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская // Материалы летнего медицинского интернет – форума. Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2018. – Т. 8. – № 1. – С. 1687.
9. Леонтьев, М.А. Тромбоцитарная формула здоровых новорожденных / **М.А. Леонтьев**, Е.Б. Родзаевская // Тезисы XIV Конгресса международной ассоциации морфологов. Морфология. – 2018. – № 3. – С. 168-169.

10. Леонтьев, М.А. Тромбоцитарная формула новорожденных при патологии / **М.А. Леонтьев, Е.Б. Родзаевская** // Тезисы Всероссийского конгресса «Боткинские чтения». – 2018. – С. 224-225.
11. Леонтьев, М.А. Функциональная способность тромбоцитов новорожденных при патологии / **М.А. Леонтьев, Е.Б. Родзаевская** // Сборник научных работ VIII межвузовской научно – практической конференции студентов и молодых ученых. / под общ. ред. Н.А. Лысова. – Самара: Медицинский университет «Реавиз». – 2018. – С. 48.
12. Родзаевская, Е.Б. Тромбоциты новорожденных в норме и при патологии : монография / Е.Б. Родзаевская, **М.А. Леонтьев, В.В. Масляков**. – Самара ; Саратов : Медицинский университет «Реавиз», 2019 – 130 с.

Список сокращений

дин/см² – внесистемная единица измерения прочности
 мкл – микролитр
 мкм – микрометр
 мм – миллиметр
 нм – нанометр
 ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
 ССВО - синдром системного воспалительного ответа
 ТЭГ – тромбоэластография
 ХВГП – хроническая внутриутробная гипоксия плода
 ЭДТА К₃ – калиевая соль этилендиамидтетрауксусной кислоты
 G – прочность (показатель ТЭГ)
 ICSN (International Committee for Standardization in Hematology) – международный комитет по стандартизации в гематологии
 МА – максимальная амплитуда (показатель ТЭГ)
 MPV (mean platelet volume) – средний объем тромбоцита
 PCT (platelet crit) – тромбокрит
 PDW (platelet distribution width) – ширина распределения по объему