

А.С. ГАВРИШ,
Е.Н. КИЛИМНИК, О.Л. КИНДЗЕРСКАЯ
ННЦ «Институт кардиологии им. акад. Н.Д. Стражеско»
НАМН Украины, Киев
E-mail: kylym@ukr.net

ТРОМБОЦИТАРНОЕ ЗВЕНО СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ СТРЕССОРНОЙ СИТУАЦИИ



Изменения морфофункционального состояния тромбоцитов изучали на модели эмоционально-болевого стресса, воспроизводившегося на кролях массой 2,5–3 кг посредством нерегулярного воздействия электрического тока малой интенсивности. Тромбоциты из венозной крови выделяли путем последовательного центрифугирования. Полученный материал исследовали суправитально с использованием люминесцентного красителя акридинового оранжевого, тестов с силиконированным стеклом и электронно-микроскопически. Цитохимически выявляли некомпенсированные отрицательные заряды гликозаминогликанов, Ca^{2+} , активность АТФазы, щелочной фосфатазы, аденилатциклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, моноаминоксидазы. В результате установлены морфофункциональные эквиваленты дестабилизирующего влияния хронической стрессорной ситуации на кровяные пластинки, проанализированы мембранотропные и рецептор-опосредованные механизмы его реализации.

© А.С. ГАВРИШ, Е.Н. КИЛИМНИК, О.Л. КИНДЗЕРСКАЯ, 2012

Введение. Общий адаптационный синдром — универсальная защитно-приспособительная реакция в ответ на различные неблагоприятные воздействия. При повышении интенсивности таких воздействий защитно-приспособительная реакция легко трансформируется в дистресс, который постепенно истощает механизмы поддержания гемостаза целостного организма [1–3]. При этом хронический стресс закономерно становится неблагоприятным фоном для любых патологических процессов, усугубляя их течение [4]. В этой ситуации система гемостаза не является исключением, и дисбаланс ее прогемостатического и антигемостатического звеньев приводит к нарушению реологических свойств крови, создавая предпосылки для тромбообразования в магистральных сосудах с возможностью фатальных последствий. При этом тромбоциты, являющиеся ключевым элементом этой системы, оказываются одной из мишеней дестабилизирующего воздействия хронического стресса, в связи с чем изучение его морфофункциональных эквивалентов и определило основную цель настоящей работы.

Материалы и методы. Стрессорную ситуацию воспроизводили по методике Меерсона [2] в нашей модификации [5]. Критерием стрессорного эффекта являлось повышение уровня 11 кортикостероидов в плазме крови с $15,4 \pm 1,9$ до $50,4 \pm 4,7$ мкг на 100 мл. Общая продолжительность эксперимента составляла 10 сут. Исследования выполнены на 10 кролях массой 2,5–3,5 кг. Контрольную группу составили 7 животных.

Кровь для исследований получали из краевой вены уха. Для люминесцентно-микроскопического исследования тромбоциты в обогащенной ими плазме окрашивали акридиновым оранжевым [6]. Кровяные пластинки и их агрегаты подсчитывали в 10–30 полях зрения при увеличении $\times 400$. Реактивность кровяных пластинок оценивали посредством теста на их способность осаждаться на чужеродной поверхности (силиконированном стекле) [7].

Для изучения ультраструктуры и цитохимических исследований тромбоциты осаждали дополнительным центрифугированием обогащенной ими плазмы, в которую добав-

ляли глютар- и параформальдегид соответственно до 0,4%- и 1%-ной концентрации [8]. Полученные образцы дофиксировали изотоническим забуференным 1%-ным раствором OsO_4 , обезвоживали и помещали в эпоксидные смолы по стандартной прописи [9]. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-8800 (Швеция), которые в случае необходимости контрастировали солями тяжелых металлов и исследовали в электронном микроскопе ПЭМ-125К (Украина).

Цитохимически определяли распределение и концентрацию анионных групп гликозаминогликанов (реакция связывания ферризоля), активность АТФазы, аденилатциклазы (АДЦ), фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов (ФДЭ), моноаминоксидазы (МАО), щелочной фосфатазы (ЩФ) [10], концентрацию и распределение Ca^{2+} [11].

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты суправитального люминесцентно-микроскопического исследования продемонстрировали дестабилизирующее влияние хронической стрессорной ситуации на тромбо-

цитарное звено системы гемостаза экспериментальных животных (таблица). При этом было отмечено нарушение способности тромбоцитов к кумулированию биогенных аминов, констатируемое по снижению интенсивности их свечения как желтым, так и зеленым цветом, соответствующим присутствию в кровяных пластинках адреналина и норадреналина [6].

В периферическом кровотоке достоверно возросло количество активированных форм кровяных пластинок. Их адгезивность повышалась, увеличивая как число тромбоцитарных агрегатов в кровотоке, так и количество тромбоцитов, осаждающихся на силиконированном стекле (таблица).

Электронно-микроскопический анализ подтвердил сокращение доли интактных тромбоцитов и, соответственно, рост числа активированных с приблизительно равным соотношением их обратимо и необратимо дестабилизированных форм, а также увеличение количества кровяных пластинок, подвергшихся дегрануляции (таблица).

Данные морфофункционального анализа воздействия ЭБС на тромбоциты

Функциональные классы	Группы исследования	
	Контрольная	ЭБС
Люминесцентная микроскопия		
Неактивированные	86,5 ± 1,4	20,8 ± 1,1 *
Активированные	9,3 ± 1,3	50,3 ± 1,4 *
Дегранулированные	2,7 ± 0,2	5,7 ± 0,3 *
Агрегированные	1,5 ± 0,2	23,2 ± 0,5 *
Количество тромбоцитов, адгезированных к силиконированному стеклу	19,5 ± 1,5	27,4 ± 1,1 *
Электронная микроскопия		
Неактивированные	86,3 ± 0,9	24,3 ± 1,0 *
Активированные	7,0 ± 0,5	52,7 ± 2,4 *
обратимо	3,7 ± 0,7	28,3 ± 1,2 *
необратимо	3,4 ± 0,7	24,6 ± 1,7 *
Дегранулированные	2,6 ± 0,4	6,1 ± 0,8 *
Агрегированные	4,0 ± 0,4	14,2 ± 1,2 *
обратимо	68,2 ± 2,5	21,8 ± 4,6 *
необратимо	5,0 ± 0,5	42,8 ± 6,3 *
Содержание α-гранул	6,7 ± 0,1	3,5 ± 0,1 *
Содержание плотных телец	3,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2 *

* Достоверно относительно контроля.

Одним из патогенетически важных компонентов перестройки тромбоцитов является модификация их гликокаликса, подвергающегося конформационным и деструктивным изменениям различного характера и глубины. На электронограммах часто наблюдались зоны его уплотнения или, напротив, рарификации вплоть до рассеивания вещества гликокаликса с обнажением плазмалеммы (рис. 1).

При использовании теста с ферризолем в таких зонах определялось перераспределение и снижение концентрации некомпенсированных отрицательных зарядов структурированных в нем гликозаминогликанов (ГАГ) и силовых кислот. Ca^{2+} -связывающая способность гликокаликса при определении ее посредством электроно-гистохимического теста с НГА в целом коррелировала с данными о концентрации реакционно способных анионных групп.

Отклонения в ультраструктуре плазматической мембраны интактных и обратимо измененных тромбоцитов минимальны и в выраженных случаях характеризовались нечеткостью ее трехслойного рисунка, тогда как микроконфигурационные изменения фосфолипидного бислоя оболочки форменных элементов, подвергшихся активации с формированием грануломера, становятся закономерным явлением. Контрастирование плазмалеммы при выявлении Ca^{2+} во многом зависело от состояния гликокаликса. При его деструктивных изменениях маркирование плазматической мембраны ослаблялось и приобретало прерывистый характер, исчезая в зонах ее обнажения, тогда как у значительной части кровяных пластинок с относительно мало измененным гликокаликсом концентрация ионов кальция на плазмалемме даже несколько возрастала.

Хроническое стрессорное раздражение рецепторного аппарата тромбоцитов обуславливало выраженные колебания активности АДЦ с неравномерным чередованием зон интенсивного и ослабленного маркирования плазмалеммы как в границах одного тромбоцита, так и в различных кровяных пластинках, с общей тенденцией к снижению активности этого фермента по сравнению с контролем (рис. 2). В то же время маркиро-

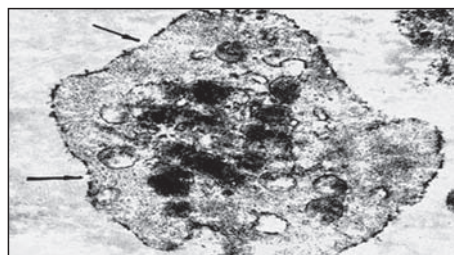


Рис. 1. Очаговая диссоциация гликокаликса тромбоцита при моделировании ЭБС. Тест с ферризо-лем. Ув. 12 000

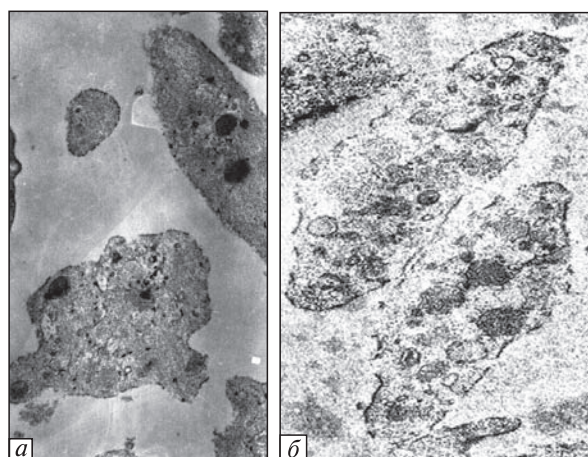


Рис. 2. Повышенная активность ФДЭ в тромбоцитах при ЭБС (а) и в контроле (б). Ув. 10 000

вание тромбоцитов при реакции на ФДЭ изменялось относительно мало, обуславливая определенный дисбаланс между воспроизводством и катаболизмом цАМФ.

Колебания катаболической способности компартиментализированных на плазмалемме АТФазы и щелочной фосфатазы также имели разнонаправленный характер с неоднозначными последствиями для морфофункциональной стабильности кровяных пластинок. Отмечавшиеся ингибирование АТФазы и активация щелочной фосфатазы при выявленных нами изменениях гликокаликса способствовали снижению Z-потенциала и росту антиадгезивности тромбоцитов. Раздражающее влияние хронической стрессорной ситуации на тромбоциты приводило к дилатации и вакуолизации поверхностной вакуолярной системы (ПВС) и активированных тромбоцитов, и кровяных пластинок без очевидных призна-

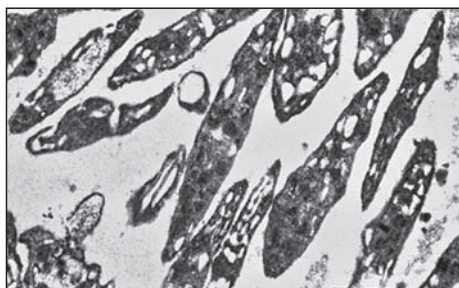


Рис. 3. Дилатация элементов ПВС тромбоцитов, обусловленная хроническим воздействием стрессорных факторов. Ув. 4500

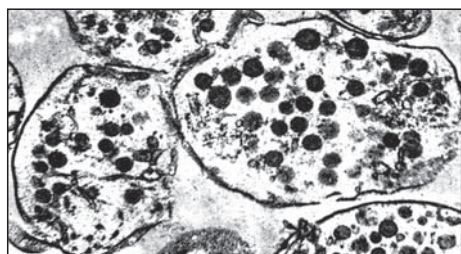


Рис. 4. Полиморфизм α -гранул тромбоцитов при моделировании ЭБС. Ув. 6000

ков такого (рис. 3). В просвете расширенных элементов ПВС обнаруживался аморфный материал различной электронной плотности, освобождающейся вовне через сообщения вакуолей с плазмалеммой, что соответствует картине вялотекущего экзоцитоза. Как и на плазмалемме, активность АДЦ на мембранах ПВС колебалась в широких границах, причем в целом она была выше, чем на поверхности тромбоцита, в то время как маркирование ФДЭ имело следовый характер, что еще более усугубляло дефицит цАМФ. В то же время при выявлении Ca^{2+} контрастирование элементов ПВС было интенсивнее, чем в контроле.

Состояние хронического раздражения истощает тромбоциты, способствуя их ускоренному износу и, соответственно, возрастающей гетерогенности по электронно-оптической плотности цитоплазматического матрикса, количеству и морфофункциональным характеристикам органелл, стимулирует хронический экзоцитоз. Среднее содержание α -гранул в кровяных пластинках экспериментальных животных было достоверно сни-

жено, при этом их число в тромбоцитах широко варьировало.

Длительно поддерживаемый вялотекущий экзоцитоз приводил к гомогенизации и снижению электронно-оптической плотности содержимого большинства этих органелл. Вместе с тем и в обратимо активированных, и в интактных тромбоцитах некоторую часть α -гранул отличало как резкое повышение, так и снижение осмиофильных свойств заключенного в них матрикса. Характерным явлением стал разброс α -гранул по величине и появление удлинённых органелл, поверхность которых иногда формировала псевдоподиеподобные выступы (рис. 4).

Интенсивность маркирования мембран α -частиц при тестировании АДЦ снижалась, мало отличаясь от отмечавшейся у ПВС, вследствие чего активность локализованной в них ФДЭ, даже оставаясь на контрольном уровне, оказывалась относительно АДЦ выше, чем у интактных животных. При активировании кровяных пластинок это атипичное соотношение энзиматической активности резко усугублялось. Маркирование мембранной оболочки α -гранул часто трансформировалось с пылевидного в мелкогранулярное, а отложения специфического осадка при реакции на ФДЭ имели вид осмиофильных глыбок, часто сливающихся в полиморфные конгломераты. Концентрация Ca^{2+} в α -гранулах также возрастала.

Параллельно с α -гранулами в тромбоцитах уменьшалось и количество плотных тельц, а их полиморфизм резко возрастал (таблица). Органеллы отличались не только размерами, но и характером и распределением своего содержимого. В различной степени выраженное уменьшение объема их осмиофильной сердцевины сочеталось с появлением электронно-прозрачной субмембранной зоны, расширяющейся по мере опорожнения органеллы. При этом в плотных тельцах сохранялась относительно высокая концентрация Ca^{2+} , а активностью моноаминоксидазы по сравнению с контролем возрастала (рис. 5).

Дистрофические и деструктивные изменения, обусловленные новыми условиями функционирования тромбоцитов, провоцировали

активацию их лизосомного аппарата с трансформированием запасательных гранул во вторичные лизосомы. В результате их количество в тромбоцитах увеличивалось, органеллы разнились как объемом, так и электронно-оптической плотностью своего неоднородного содержимого.

Все отмеченные изменения происходили на фоне нарушения энергетического метаболизма кровяных пластинок, анализировавшегося по состоянию соответствующих структур неактивированных тромбоцитов. Содержание гликогена в большинстве из них заметно снижалось.

Относительно немногочисленные гранулы полисахарида располагались в цитоплазме диффузно, лишь иногда образуя небольшие скопления, а гликогеновые пакеты не обнаруживались вовсе.

Хроническое раздражение кровяных пластинок, провоцирующее как гипертрофию митохондрий, так и их набухание с просветлением цитоплазматического матрикса, приводило к увеличению объема этих органелл. Немногочисленные отчетливо контурирующиеся кристы неповрежденных митохондрий при электронно-гистохимическом тестах на дегидрогеназы интенсивно маркируются ферроцианидом меди, количество которого резко снижалось при деструктивных изменениях внутримитохондриальной мембраны. Характерной особенностью становилась более высокая, чем в контроле, активность MAO в этих органеллах, по-видимому, обусловленная моделировавшейся ситуацией. Истощение гликогенового резерва и повреждение митохондрий часто сопровождалось парциальными некрозами, способствующими элиминированию поврежденных тромбоцитов из кровотока.

Морфологическими свидетельствами ускоренного износа и старения тромбоцитов наряду с деструктивными изменениями органелл являлись резкие колебания электроннооптической плотности их цитоплазматического матрикса, а также в определенной мере компенсаторное увеличение содержания в кровотоке мегатромбоцитов и не совсем зрелых форм с резидуальными включениями в цитоплазме (рис. 6).

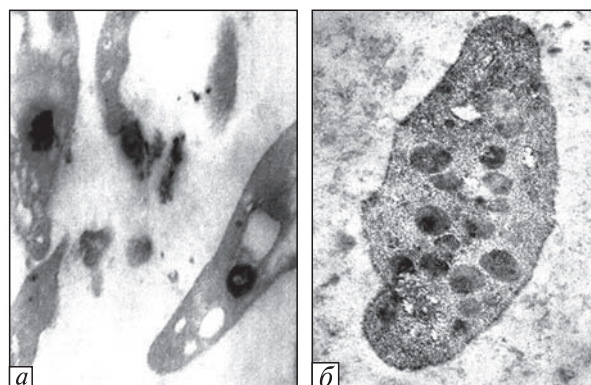


Рис. 5. Активирование MAO в тромбоцитах при хроническом ЭБС (а) и в контроле (б). Ув. 14 000

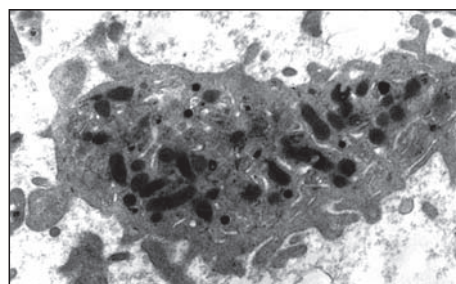


Рис. 6. Активированный мегатромбоцит с α -гранулами. Хронический ЭБС. Ув. 7000

Полученные данные показали, что хроническая стрессорная ситуация оказывала выраженное дестабилизирующее воздействие на ключевое, тромбоцитарное, звено гемостаза. Об этом свидетельствовали результаты суправитальных исследований: тромбоцитограммы по люминесцентно-микроскопическим данным, изменения способности тромбоцитов накапливать биогенные амины, взаимодействовать с чужеродной поверхностью, а также их распределение по функциональным классам на основании электронно-микроскопического исследования.

Дестабилизирующее влияние стрессорных факторов на тромбоциты реализовывалось как посредством прямого мембранотропного воздействия, так рецептор-опосредованными механизмами. Наиболее очевидными проявлениями первого являлись перестройка гликокаликса вплоть до его очаговой диссоциации, снижение барьерных свойств плазмалеммы, что способствовало повышению уровня Ca^{2+}

в тромбоцитах, стимулирующего кинетические потенции их контрактильных структур. К последствиям подобного воздействия, по видимому, может быть отнесено ингибирование мембранной эктоАТФазы с нарушением баланса АТФ и АДФ, что способствовало адгезии и агрегации кровяных пластинок. Важным фактором, стимулирующим нарушения суспензионной стабильности этих форменных элементов, являлось рецепторопосредованное активирование щелочной фосфатазы, отщепляющей фосфатные группы фосфолипидного бислоя плазмалеммы, что вместе с диссоциацией гликокаликса снижало поверхностный Z-потенциал тромбоцитов. Определенный вклад в их дестабилизацию вносили также разнонаправленные изменения активности АДЦ и ФДЭ, что обуславливало снижение уровня цАМФ, повышая реактивность кровяных пластинок.

Под долговременным влиянием стрессорных факторов наряду с гемостатической страдает и гомеостатическая функция тромбоцитов, подвергающаяся разнонаправленным изменениям. Их способность к кумулированию биогенных аминов заметно снижалась, но в то же время возрастала активность моноаминоксидазы, которая осуществляла их катаболизм.

Вместе с тем кровяные пластинки, находящиеся в состоянии вялотекущего экзоцитоза, сами становились источником целого ряда биологически активных факторов в содержащихся их плотных тельцах и α -гранулах, которые перманентно поступали в окружающую среду через дилатированные элементы ПВС и при прямом контактировании оргanelл с плазмалеммой.

Выводы. Таким образом, пролонгированная стрессорная ситуация сама по себе как неспецифическая реакция организма на неблагоприятные изменения окружающей среды [3] и как патогенетический компонент различных хронических текущих патологических процессов оказывает существенный дестабилизирующий эффект на тромбоцитарное звено гемостаза, способствуя нарушениям реологических свойств крови и создавая предпосылки для тромботических осложнений.

*O. Gavriush, O.
Kylymnyk, O. Kindzerska*

PLATELET LINK OF HOMEOSTASIS SYSTEM AT MODELING OF CHRONIC STRESS SITUATION

Changes of thrombocyte morphological and functional status were investigated in rabbits (2,5–3 kg weight) by the emotional stress model that was reproduced through stimulation with irregular low-level electric current. Thrombocytes were purified from the venous blood with sequential centrifugation. Obtained material was investigated with electron microscope using luminous coloring agent acridine orange and syliconized glass. Glycosaminoglycans and Ca^{2+} noncompensated negative electric charge, the activity of ATP, alkaline phosphatase, adenylate cyclase and phosphodiesterase of cyclical nucleotides, monoamine oxidase were cytochemically revealed. Consequently morphological and functional equivalents of chronic stress destabilization effect on blood platelets were determined. Likewise membranotropic and receptor mediated mechanisms of this effect realization were analyzed.

*O.S. Gavriush,
O.M. Kilymnyk, O.L. Kindzerska*

ТРОМБОЦИТАРНА ЛАНКА СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ХРОНІЧНОЇ СТРЕСОРНОЇ СИТУАЦІЇ

Зміни морфофункціонального стану тромбоцитів вивчали на моделі емоційно-больового стресу, який відтворювали на кролях масою 2,5–3 кг завдяки нерегулярному впливу електричного струму малої інтенсивності. Тромбоцити венозної крові виділяли за допомогою послідовного центрифугування. Отриманий матеріал досліджували суправітально із застосуванням люмінесцентного барвника акридинового жовтогарячого, тестів із силіконованим склом та електронно-мікроскопічно. Цитохімічно виявляли некомпенсовані негативні заряди глікозаміногліканів, Ca^{2+} , активність АТФ-ази, лужної фосфатази, аденілатциклази, фосфодіестерази циклічних нуклеотидів, моноаміноксидази. В результаті встановлено морфофункціональні еквіваленти дестабілізуючого впливу хронічної стресорної ситуації на кров'яні пластинки, проаналізовано мембранотропні та рецепторопосередковані механізми його реалізації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Корнацький В.М., Клименко В.І. Хвороби системи кровообігу і психічне здоров'я. — Київ, 2009. — 176 с.

2. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.
3. *Соколов Е.И.* Эмоции, гормоны и атеросклероз. – М.: Наука, 1991. – 294 с.
4. *Симоненков А.П., Федоров В.Д.* Современная концепция стресса и адаптации с учетом новых данных о генезе тканевой гипоксии // Вест. Рос. АМН. – 2008. – № 5. – С. 7–14.
5. *Гавриш А.С., Хаджинский В.Г., Сергиенко О.В., Трунина И.В., Шульц Н.В.* Ультраструктура и метаболизм рабочих клеток миокарда при стрессорном воздействии // Цитология и генетика. – 2001. – 35, № 5. – С. 54–59.
6. *Ладный А.И., Кондаков И.К., Ермакович И.И.* Экспресс-метод оценки морфофункционального состояния тромбоцитов // Лаб. дело. – 1988. – № 2. – С. 27–29.
7. *Васильева Е.Ю., Орлов В.Н., Васильева М.И.* Оценка состояния тромбоцитов при остром инфаркте миокарда // Кардиология. – 1983. – № 7. – С. 43–47.
8. *Вашкинель В.К., Петров М.Н.* Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. – Л.: Наука, 1982. – 88 с.
9. *Каруну В.Я.* Электронная микроскопия. – К.: Вища шк., 1984. – 208 с.
10. *Гайер Г.* Электронная гистохимия : Пер. с нем. – М.: Мир, 1974. – 488 с.
11. *Zechmeister A.* A new selective ultrahistochemical method for the demonstration of calcium using N,N'-naphtholylhydroxylamine // Histochem. – 1979. – 61, № 2. – P. 229–239.

Поступила 01.03.11