

Н.О.Перцева

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: артеріальна гіпертензія, цукровий діабет 2 типу, гранули тромбоцитів, ультраструктура, блокатори рецепторів ангіотензину II.

Надійшла: 28.04.2016

Прийнята: 25.05.2016

УДК 616.155.1-008.64:616.1-06

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ ГРАНУЛ ТРОМБОЦИТІВ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ З АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕРТЕНЗІЄЮ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ БЛОКАТОРІВ РЕЦЕПТОРІВ АНГІОТЕНЗИНУ II

Резюме. Проведено кількісну оцінку ультраструктурних змін різних типів гранул тромбоцитів у пацієнтів з артеріальною гіпертензією, а також у хворих на артеріальну гіпертензію і цукровий діабет 2 типу при корекції артеріального тиску лозартаном. Показано, що обмежена дегрануляція у пацієнтів з артеріальною гіпертензією відбувається за рахунок екзоцитозу дельта-гранул, вміст яких нормалізується через 9 місяців антигіпертензивної терапії. Корекція артеріальної гіпертензії у хворих на цукровий діабет із застосуванням лозартану калію призводить до значного відновлення вмісту альфа-гранул, нормалізації вмісту щільних тілець та обмеження лізосомальної активності.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 40-44.

© Н.О.Перцева, 2016

✉ npertseva@dsma.dp.ua

Pertseva N.O. Ultrastructural changes of platelet granules in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension in applying of angiotensin II receptor antagonists.

ABSTRACT. Background. Disorders of hemostasis in patients with arterial hypertension and diabetes mellitus type 2 are complex: growing aggregative activity of platelets and red blood cells, activation and degranulation of platelet antiaggregatory potential endothelium; reduced anticoagulant and fibrinolytic activity of blood. **Objective.** Quantification of ultrastructural changes in different types of platelet granules in patients with hypertension with high cardiovascular risk influenced the treatment losartan potassium. **Methods.** Ultrastructural studies of platelet granules was performed in 5 patients with hypertension 2nd degree (first clinical group), 10 patients with hypertension (second group) of degree 2 with type 2 diabetes in the stage subcompensation and 5 volunteers – healthy individuals (control group). To correct blood pressure was used angiotensin II receptor antagonist losartan (Lozap®, Zentiva). Ultrastructural analysis was performed at baseline and at 3, 6, 9 and 12 months of treatment. **Results.** For a detailed analysis of the process of activation and degranulation of platelets using transmission electron microscopy was carried out differential counting packing density of alpha and delta granules consisting granulomera and numerical density lambda granules. In patients with hypertension platelet aggregation capacity was the most sensitive element of damage platelet hemostasis, which could largely normalized since 6-month use of losartan potassium. In the group of patients with hypertension and diabetes mellitus type 2, in which the initial contents degranulated platelets was sharply increased, there was a significant positive trend for treatment involving losartan, which indicates its significant contribution to achieving normalization of degranulated forms. **Conclusion.** Treatment with losartan potassium leads to a significant recovery of alpha-granules, normalize the content of dense bodies and limitations of lysosomal activity in all groups.

Key words: hypertension, diabetes mellitus type 2, platelet granules, ultrastructure, angiotensin II receptor antagonists.

Citation:

Pertseva NO. [Ultrastructural changes of platelet granules in patients with type 2 diabetes mellitus and hypertension in applying of angiotensin II receptor antagonists]. Morphologia. 2016;10(2):40-4. Ukrainian.

Вступ

Порушення гемостазу при артеріальній гіпертензії (АГ) та цукровому діабеті (ЦД) 2 типу мають комплексний характер: зростають агрегаційна активність тромбоцитів і еритроцитів, активація та дегрануляція тромбоцитів, антиагрегаційний потенціал ендотелію; знижується антикоагулянтна й фібринолітична активність крові. Концентрація вазоактивних і тромбогенних по-

хідних арахідонової кислоти – простагландинів і тромбоксанів – у крові підвищується, одночасно знижується вміст речовин, що мають антиагрегаційну і антитромбогенну дію [1]. Проте патогенез коагулопатичного синдрому при АГ та ЦД 2 типу залишається недостатньо з'ясованим, однією з причин чого є істотна гетерогенність гранул тромбоцитів і надзвичайно складний характер перебудов різних типів гранул під час активації і

дегрануляції клітин.

Хоча тромбоцити містять три типи гранул, більшість функціонально активних і регуляторних білків локалізовано в альфа-гранулах [2]. Альфа-гранули мають складне походження: з одного боку, їх вміст формується за рахунок регульованої клітиною секреції, з іншого – шляхом ендцитозу під час визрівання у складі мегакаріоцита через утворення мультивезикулярних тілець [3]. В тромбоцитах альфа-гранули можуть зливатися з мембранами відкритої каналцевої системи і з плазматичною мембраною при незворотній активації з подальшим вивільненням їх вмісту і 4-разовим збільшенням площі поверхні тромбоцита [4]. За нормальних умов альфа-гранули можуть займати до 10% від обсягу тромбоцита [5]. Дельта-гранули переважно містять неметаболичні АТФ і АДФ, серотонін і кальцій. Тромбоцити, будучи секреторними клітинами, після стимуляції вивільняють велику кількість активних субстанцій, виконують таким шляхом транспортну функцію і регулюють багато процесів в організмі, у тому числі і мегакаріоцитопоез.

Останніми роками дослідники звернули увагу на гетероморфність альфа-гранул у зв'язку з їх динамічними змінами у складі тромбоцита, що утруднює ідентифікацію везикулярних ультраструктур з тієї обставини, що дотепер не виявлено жодного надійного маркера альфа-гранул. Це передбачає подальші уточнення у визначенні гранул з мірою накопичення відомостей про їх формування, структуру та вміст [6; 7].

У роботах по оцінці ефективності антигіпертензивної терапії був виявлений виразний окислювальний стрес за рахунок збільшення окисного метаболізму і прооксидантної активності крові, ознаки ендотеліальної дисфункції у хворих на АГ у порівнянні з нормотензивними донорами. У дослідженнях показано здатність блокаторів рецепторів ангіотензину II та інгібіторів АПФ, на відміну від бета-адреноблокаторів, нормалізувати баланс про- і антиоксидантної активності, окислювальний стрес і ендотеліальну функцію, включаючи активність прозапальних цитокінів і прокоагулянтних факторів, при АГ 2 ступеня тяжкості [8]. Показано, зокрема, що застосування лозартану у хворих на АГ при метаболічному синдромі впродовж 16 тижнів спричиняло позитивний вплив на синдром пероксидації та оптимізувало агрегацію тромбоцитів [9].

Отже, антигіпертензивна терапія із залученням антагоністів рецепторів ангіотензину II у хворих на АГ дозволяє досягнути оптимізуючого та нормалізуючого впливу на певні патогенетичні ланки коагулопатії, проте актуальним залишається визначення структурних особливостей внутрішньоклітинних патоморфологічних процесів, що відбуваються у складі ушкоджених ланок гемостазу при активації, дегрануляції й агрегації тромбоцитів протягом лікування.

Мета дослідження – кількісна оцінка ультраструктурних змін різних типів гранул тромбоцитів у пацієнтів з АГ з високим кардіоваскулярним ризиком під впливом лікування лозартаном калію.

Матеріали та методи

Ультраструктурне дослідження гранул тромбоцитів проводили у 5 пацієнтів з АГ 2 ступеня (перша клінічна група), 10 хворих на АГ (друга група) 2 ступеня і ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і у 5 волонтерів – практично здорових осіб (контрольна група). Для корекції артеріального тиску застосовували антагоніст рецепторів ангіотензину II лозартан (Лозап®, Zentiva). Ультраструктурний аналіз проводили на початку дослідження, а також через 3, 6, 9 і 12 місяців лікування.

Для ультраструктурного аналізу тромбоцитів 5 мл венозної крові центрифугували у гепаринізованій пробірці в режимі 900 об/хвил протягом 15 хвилин при температурі $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Фракцію збагаченої тромбоцитами плазми переносили у префіксаційний розчин (у співвідношенні 1:5), який містив 0,1%-ний розчин глютарового альдегіду ("SP1", США) у 0,1М фосфатному буфері (рН 7,4) при кімнатній температурі. Через 30 хвилин суспензію центрифугували при 3000 об/хвил протягом 10 хвилин.

Осад з тромбоцитами використовували для виготовлення суспензії для подальшого дослідження у відповідності з рекомендаціями С.Л. Sawatzke, С. Solomons [10]. Зразки протягом 2 годин фіксували при $+2^\circ\text{C}$ в 3%-ному розчині глютарового альдегіду, виготовленому на 0,2М фосфатному буфері (рН 7,4). Матеріал переносили для постфіксації в 1%-ний забуферений (рН 7,4) розчин тетроксиду осмію ("SP1", США) на 1 годину. Зневоднювали зразки за допомогою пропіленоксиду в розчинах зростаючої концентрації. Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епон-аралдіт.

Зрізи контрастували за Рейнольдсом протягом 30 хвилин. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 ("SELM", Україна) при напрузі прискорення 65-90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 20000. У цілому, електронномікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою [11].

Для кількісної оцінки ультраструктурних змін визначали щільність упакування альфа-гранул, дельта-гранул, чисельну щільність лямбда-гранул у складі грануломера тромбоцитів. Визначення вірогідності розходжень між вибірками проводили з урахуванням парного t-критерію Стьюдента. При проведенні статистичної обробки отриманих квантифікованих результатів усі необхідні розрахунки виконували за допомогою ліцензійної програми Statistica (версія 6.1; серійний номер AGAR 909 E415822FA).

Результати та їх обговорення

Для детального аналізу процесу активації і дегрануляції тромбоцитів за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії було проведено диференційований підрахунок щільності упаковки альфа- і дельта-гранул у складі грануломера, а також чисельної щільності лямбда-гранул. У хворих першої клінічної групи вміст альфа-гранул коливався в межах $87\text{-}104 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^3$ і суттєво не відрізнявся від контрольного рівня на жодному з етапів дослідження.

Тромбоцити збагаченої фракції крові через 3 міс лікування лозартаном калію містили характерну незмінену кількість альфа-гранул з суцільним мембранним оточенням і помірною електронною щільністю. Часто спостерігалися клітини з розвинутою відкритою канальцевою системою і з лабільною зовнішньою мембраною. Як правило, такі клітини безпосередньо контактували одна з одною, утворюючи дрібні тромбоцитарні агрегати. Вміст альфа-гранул у них і їх локалізація не відрізнялись від контролю, що вказувало

на відносну незалежність процесу агрегатоутворення від стану альфа-гранул.

У хворих на АГ з супутнім ЦД 2 типу початкове значення параметра майже вдвічі поступалося контрольному рівню. Протягом лікування відбувалося поступове зростання вмісту альфа-гранул, проте навіть через 12 міс спостереження параметр значно поступався величині контролю – на 40,8% ($p < 0,05$). Морфологічно гранули дегранульованих тромбоцитів були наближені до поверхні або безпосередньо взаємодіяли з відкритою канальцевою системою, були збільшеними за діаметром, часто мали знижену електронну щільність і фрагментовану мембрану. Також зустрічалися невеликі альфа-гранули у внутрішніх ділянках грануломера з помірною щільністю матеріалу. Утворення псевдоподій тромбоцитів було обмеженим. Менша частина клітин містила велику кількість альфа-гранул, що з високою щільністю заповнювали майже весь внутрішній простір тромбоцита (рис. 1А).

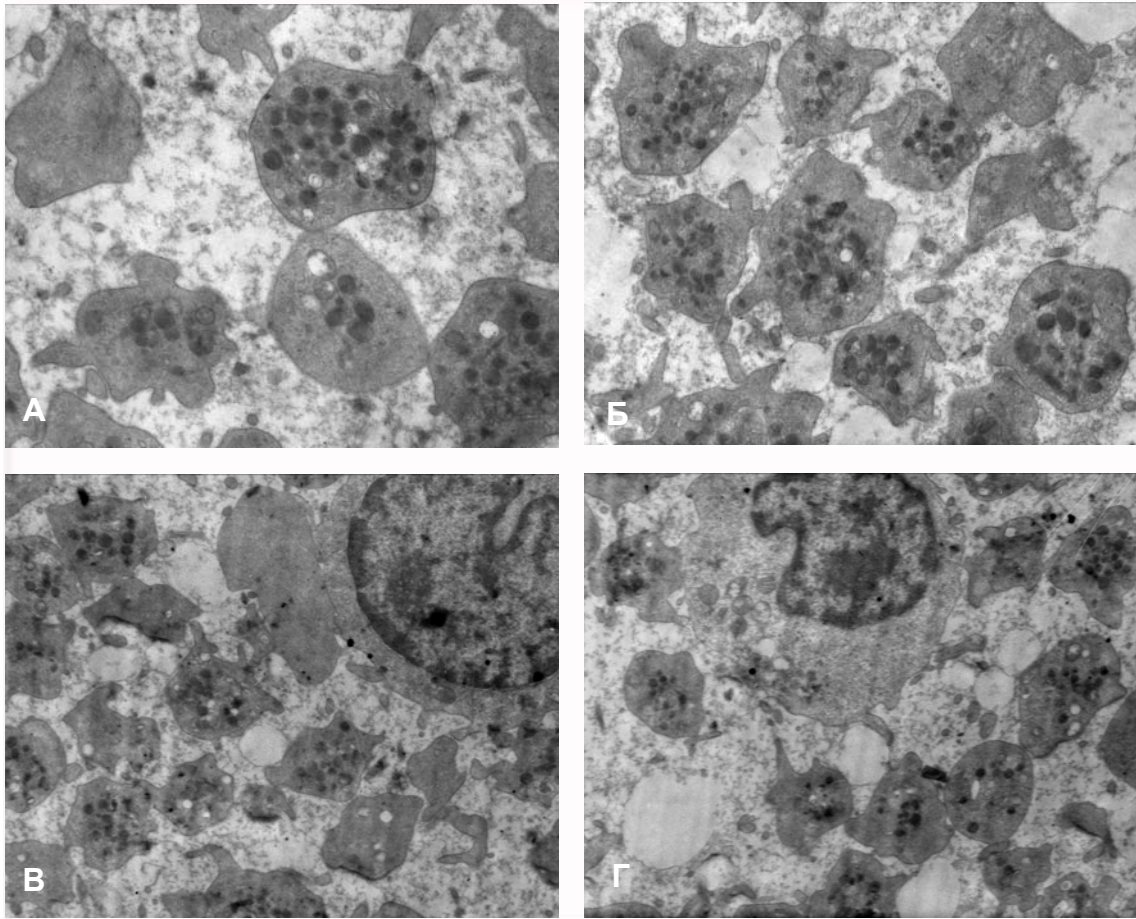


Рис. 1. А – ультраструктура тромбоцитів крові хворої на АГ 2 ступеня і ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем через 12 місяців спостереження. Електронограма. $\times 12000$. Б – ультраструктура тромбоцитів крові пацієнтки з АГ 2 ступеня через 12 місяців спостереження. Електронограма. $\times 12000$. В – ультраструктура тромбоцитів крові хворої на АГ 2 ступеня і ЦД 2-типу з субоптимальним глікемічним контролем через 3 місяці спостереження. Електронограма. $\times 8000$. Г – ультраструктура тромбоцитів крові хворої на АГ 2 ступеня і ЦД 2-типу з субоптимальним глікемічним контролем через 6 місяців спостереження. Електронограма. $\times 8000$.

Ультраструктурне дослідження дельта-гранул тромбоцитів на початку спостережень дозволило встановити достовірно знижений їх вміст порівняно з контролем у всіх клінічних групах: у першій – на 24,1%, у другій – на 34,5%, що вказує на залучення матеріалу цих гранул до реалізації патогенетичних ланок АГ, ЦД 2 типу та їх сполучення. Протягом лікування у всіх пацієнтів спостерігалось поступове відновлення щільності упакування дельта-гранул, проте у неоднаковий спосіб та на різних етапах.

Зокрема, в першій клінічній групі нормалізація вмісту щільних тілець відбувалася через 9 місяців антигіпертензивної терапії із застосуванням лозартану калію переважно за рахунок збільшення кількості дрібних гранул. Через 12 міс лікування у даних пацієнтів щільність упакування гранул достовірно не поступалася контрольному рівню і перевищувала початкові величини на 23,9% ($p < 0,05$). Наприкінці дослідження у крові даних хворих виявлялися тромбоцити із сформованими гранулами, розташованими переважно в центральній зоні грануломера. Мембранне оточення щільних тілець було безперервним у більшості спостережень. У складі псевдоподій дельта-гранули не відзначалися (рис. 1Б).

У пацієнтів другої клінічної групи помірне відновлення вмісту дельта-гранул тривало протягом всього періоду спостережень і лише наприкінці дослідження втрачало статистичну відмінність від контрольного рівня, перевищуючи початкове значення на 29,4% ($p < 0,05$). На початкових термінах лікування у складі грануломера спостерігалися як збільшені за діаметром гранули, так і численні дрібні щільні тільця. Через 3 і 6 міс, саме у період найнижчих значень щільності упакування дельта-гранул за весь досліджуваний період, у складі гетероморфних тромбоцитів спостерігалися ознаки деструкції мембран гранул, відкритої каналцевої системи і зовнішньої тромбоцитарної мембрани. Внутрішньоклітинні структури розподілялися нерівномірно, поверхневий апарат тромбоцитів поряд з різноманітним рельєфом мав значні порушення глікокалікса у більшості випадків. Характерним було наближення дегранульованих форм або клітин з найбільш ушкодженою структурою до поверхні лейкоцитів (рис. 1В, 1Г).

Визначення чисельної щільності лямбда-гранул, які за своїми морфологічними і біохімічними властивостями відповідають ознакам лізосом, не виявило будь-яких істотних змін у пацієнтів першої клінічної групи ні на початку дослідження, ні протягом 1 року проведеної антигіпертензивної терапії.

Навпроти, у хворих на АГ з ЦД 2 типу з початково майже незмінним вмістом лямбда-гранул спостерігалось поступове зменшення кількості лізосом зі стабілізацією параметра на рівні 73-82 μm^2 починаючи з 6-го місяця дослідження. Наприкінці досліджуваного періоду чисельна щільність лямбда-гранул у даній клінічній групі поступалася початковому рівню на 36,0% ($p < 0,05$), контрольному – на 46,7% ($p < 0,05$). При цьому лізосоми мали звичайні розміри, помірну електронну щільність і суцільну мембрану. Поряд зі зниженою кількістю лямбда-гранул це свідчило про обмежену лізосомальну активність.

Висновки

1. У пацієнтів з АГ саме агрегаційний потенціал тромбоцитів є найбільш чутливою ланкою ушкодження тромбоцитарного гемостазу, яку вдавалося значною мірою нормалізувати починаючи з 6-го місяця застосування блокатора рецепторів ангіотензину II.

2. У групі хворих з АГ та ЦД 2-го типу, в якій початковий вміст дегранульованих тромбоцитів є різко підвищеним, спостерігається істотна позитивна динаміка протягом лікування із залученням блокатора рецепторів ангіотензину II, що свідчить про його суттєвий внесок у досягнення нормалізації вмісту дегранульованих форм.

3. Лікування АГ із застосуванням блокатора рецепторів ангіотензину II призводить до значного відновлення вмісту альфа-гранул, нормалізації вмісту щільних тілець та обмеження лізосомальної активності у всіх досліджуваних групах.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з аналізом внутрішньоклітинних реакцій тромбоцитів, лейкоцитів і еритроцитів у хворих на АГ з високим кардіоваскулярним ризиком, а саме з супутнім ЦД 2 типу при корекції артеріального тиску.

Літературні джерела References

1. Shilov AM. Gipertenziya i reologiya krovi [Hypertension and blood rheology]. Moscow: BARS; 2005. 328 p. Russian.
2. Blair P. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. Blood Rev. 2009;23(4):177-89.

3. Woodman PG, Futter CE. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. Curr Opin Cell Biol. 2008;20:408-14.
4. White JC, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets—a fenestrated membrane system. Am J Pathol.

1980;101:353-64.

5. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev.* 1982;62:185-261.

6. Sehgal S, Storrie B. Evidence that differential packaging of the major platelet granule proteins von Willebrand factor and fibrinogen can support their differential release. *J Thromb Haemost.* 2007;5:2009-16.

7. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha-granules and differentially released. *Blood.* 2008;111:1227-33.

8. Vaskina EA, Tsirendorzhiyev DD, Demina LM. Rol neytrofilov i prooksidantnogo potentsiala krovi v razvitiy endotelialnoy disfunktsii pri arterialnoy gipertenzii [Role of neutrophils and pro-oxidant capacity of the blood in the development of endo-

thelial dysfunction in hypertension]. *Bulletin SO RAMN.* 2003;2:107-12. Russian.

9. Medvedev IV, Kumova TA. Oslablenie agregatsionnoy sposobnosti trombotsitov u bolnykh arterialnoy gipertoniey pri metabolicheskom sindrome na fone losartana. [Weakening aggregability platelets in hypertensive patients with metabolic syndrome on a background of losartan]. *Russ J Cardiol.* 2008;5:53-5. Russian.

10. Sawatzke CL, Solomons CC. Fixation and embedding of small volumes of platelets for transmission electron microscopy. *J Clin Pathol.* 1980;33(6):600-2.

11. Mironov AA, Komissarchik YuYa, Mironov VA. *Metody elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo.* [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science; 1994. 400 p. Russian.

Перцева Н.О. Ультраструктурные изменения гранул тромбоцитов у больных сахарным диабетом 2 типа с артериальной гипертензией при применении блокаторов рецепторов ангиотензина II.

Реферат. Проведена количественная оценка ультраструктурных изменений различных типов гранул тромбоцитов у пациентов с артериальной гипертензией, а также у больных артериальной гипертензией и сахарным диабетом 2 типа при коррекции артериального давления лозартаном. Ограниченная дегрануляция у пациентов с артериальной гипертензией происходит за счет экзоцитоза дельта-гранул, содержание которых нормализуется через 9 месяцев антигипертензивной терапии. Коррекция артериальной гипертензии у больных сахарным диабетом с применением лозартана калия приводит к значительному восстановлению содержания альфа-гранул, нормализации содержания плотных телец и ограничению лизосомальной активности.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа, гранулы тромбоцитов, ультраструктура, блокаторы рецепторов ангиотензина II.