

**І.В.Твердохліб
Н.О.Перцева
Т.С.Турлюн**

ДЗ «Дніпропетровська
медична академія МОЗ
України»

Ключові слова: артеріальна гіпертонія, цукровий діабет 2 типу, гранули тромбоцитів, ультраструктура, лозартан.

Надійшла: 28.04.2014

Прийнята: 25.05.2014

УДК 616.155.1-008.64:616.1-06

ДИНАМІКА МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ГРАНУЛ ТРОМБОЦИТІВ У ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ З ВИСОКИМ КАРДІОВАСКУЛЯРНИМ РИЗИКОМ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ЛОЗАРТАНУ КАЛІЮ

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-го 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. – 2014. – Т. 8, № 2. – С. 61-66.

© І.В.Твердохліб, Н.О.Перцева, Т.С.Турлюн, 2014

✉ turlyunt@gmail.com

Tverdokhlebl I.V., Pertseva N.O., Turliun T.S. Dynamics of morphological changes of platelet granules in patients with hypertension and high cardiovascular risk in applying losartan potassium.

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. **Conclusion.** In patients with hypertension namely 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. 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, losartan.

Citation:

Tverdokhlebl IV, Pertseva NO, Turliun TS. [Dynamics of morphological changes of platelet granules in patients with hypertension and high cardiovascular risk in applying losartan potassium]. *Morphologia*. 2014;8(2):61-6. Ukrainian.

Вступ

Порушення гемостазу при артеріальній гіпертензії (АГ) та цукровому діабеті (ЦД) 2-го типу мають комплексний характер: зростають агрегаційна активність тромбоцитів і еритроцитів, активація та дегрануляція тромбоцитів, антиагрегаційний потенціал ендотелію; знижується анти-

коагулянтна й фібринолітична активність крові. Концентрація вазоактивних і тромбогенних похідних 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-го 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 клітинної 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 вну-

трішньоклітинних 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-го ступеня (перша клінічна група), 10 хворих на АГ (друга група) 2-го ступеня з ЦД 2-го типу у стадії субкомпенсації 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 глутарового 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 C.L.Sawatzke, C.Solomons [10]. Зразки протягом 2 годин фіксували при $+2^\circ\text{C}$ в 3%-ному розчині глутарового 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 при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-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 оброб-

ки 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 $87-104 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^3$ і суттєво не відрізнявся від контрольного рівня на жодному з етапів дослідження (табл. 1).

Таблиця 1
Щільність упаковки альфа-гранул ($\times 10^{-3} \text{ мкм}^3/\text{мкм}^3$), $M \pm m$

Термін дослідження	Клінічні групи	
	Перша	Друга
На початку дослідження	$94,5 \pm 12,6$	$56,7 \pm 7,9^*$
Через 3 міс	$98,8 \pm 10,8$	$52,2 \pm 6,3^*$
Через 6 міс	$103,2 \pm 15,2$	$58,9 \pm 7,6^*$
Через 9 міс	$87,4 \pm 13,1$	$61,6 \pm 7,5^*$
Через 12 міс	$95,6 \pm 13,7$	$64,0 \pm 7,8^*$

Примітки: 1) * – достовірна відмінність від групи контролю ($108,1 \pm 7,7 \times 10^{-3} \text{ мкм}^3/\text{мкм}^3$).

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 каналцевою 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 (рис. 1).

У хворих на АГ з супутнім ЦД 2-го 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 каналцевою 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. 2).

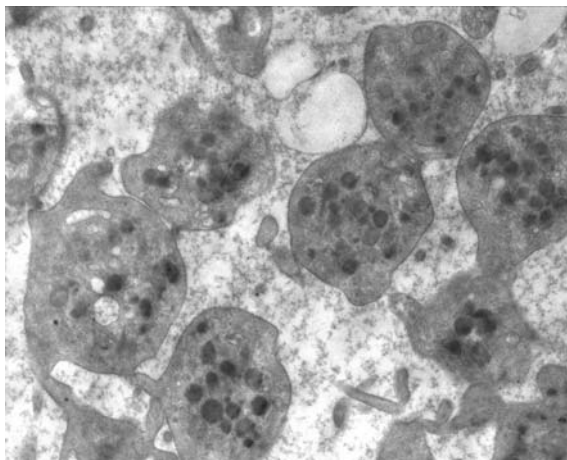


Рис. 1. Ультраструктура тромбоцитів крові пацієнта з АГ 2-го ступеня через 3 місяці спостереження. Електроннограма. $\times 12000$.

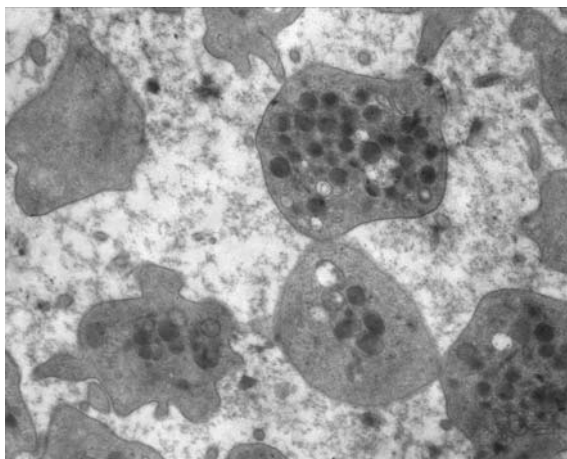


Рис. 2. Ультраструктура тромбоцитів крові хворої на АГ 2-го ступеня з ЦД 2-го типу у стадії субкомпенсації через 12 місяців спостереження. Електроннограма. $\times 12000$.

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-го типу та їх сполучення (табл. 2). Протягом лікування у всіх пацієнтів спостерігалося поступове відновлення щільності упаковки дельта-гранул, проте у неоднаковий спосіб та на різних етапах.

Таблиця 2
Щільність упакування дельта-гранул ($\times 10^{-3}$ мкм³/мкм³), $M \pm m$

Термін дослідження	Клінічні групи	
	Перша	Друга
На початку дослідження	28,4 \pm 2,3*	24,5 \pm 2,1*
Через 3 міс	29,3 \pm 2,8*	23,8 \pm 2,6*
Через 6 міс	29,1 \pm 3,5*	27,2 \pm 3,4*
Через 9 міс	31,6 \pm 4,0	29,1 \pm 2,9*
Через 12 міс	35,2 \pm 3,1**	31,7 \pm 2,4**

Примітки: 1) * – достовірна відмінність від групи контролю ($37,4 \pm 4,2 \times 10^{-3}$ мкм³/мкм³); 2) ** – достовірна відмінність від вихідного значення.

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. 3).

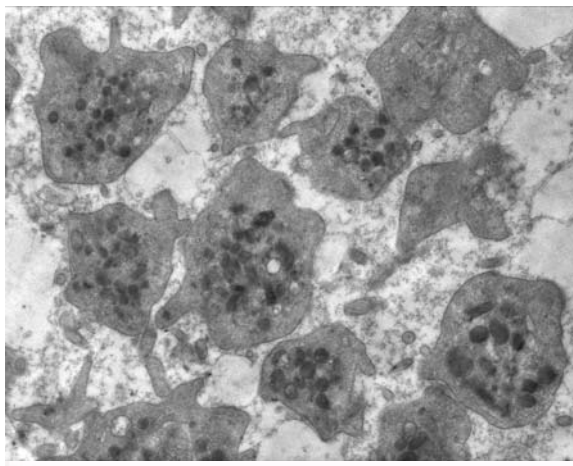


Рис. 3. Ультраструктура тромбоцитів крові пацієнтки з АГ 2-го ступеня через 12 місяців спостереження. Електронорама. $\times 12000$.

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. 4, 5).

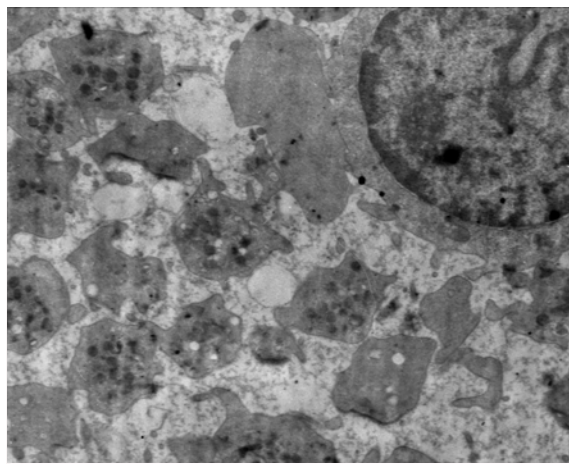


Рис. 4. Ультраструктура тромбоцитів крові хворої на АГ 2-го ступеня та ЦД 2-типу у стадії субкомпенсації через 3 місяці спостереження. Електронорама. $\times 8000$.

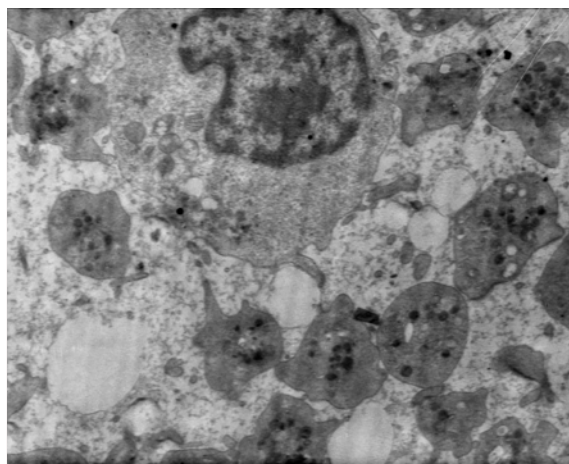


Рис. 5. Ультраструктура тромбоцитів крові хворої на АГ 2-го ступеня та ЦД 2-типу у стадії субкомпенсації через 6 місяців спостереження. Електронорама. $\times 8000$.

Визначення чисельної щільності лямбда-гранул, які за своїми морфологічними і біохімічними властивостями відповідають ознакам лізосом, не виявило будь-яких істотних змін у паціє-

нтів першої клінічної групи ні на початку дослідження, ні протягом 1 року проведеної антигіпертензивної терапії (табл. 3).

Таблиця 3
Чисельна щільність лямбда-гранул ($\times 10^{-3}$ мкм²),
M \pm m

Термін дослідження	Клінічні групи	
	Перша	Друга
На початку дослідження	134 \pm 14	114 \pm 13
Через 3 міс	122 \pm 11	107 \pm 9*
Через 6 міс	125 \pm 15	82 \pm 7*
Через 9 міс	118 \pm 12	74 \pm 8* **
Через 12 міс	128 \pm 14	73 \pm 9* **

Примітки: 1) * – достовірна відмінність від групи контролю ($137\pm 15 \times 10^{-3}$ мкм²); 2) ** – достовірна відмінність від вихідного значення.

Навпроти, у хворих на АГ з ЦД 2-го типу з початково майже незміненим вмістом лямбда-гранул спостерігалось поступове зменшення кількості лізосом зі стабілізацією параметра на рівні 73-82 мкм² 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.

Підсумок

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-го типу при корекції артеріального тиску.

Літературні джерела References

- Shilov AM. Gipertenziya i reologiya krovi [Hypertension and blood rheology]. Moscow: BARS; 2005. 328 p. Russian.
- Blair P. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. Blood Rev. 2009;23(4):177-89.
- Woodman PG, Futter CE. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. Curr Opin Cell Biol. 2008;20:408-14.
- White JC, Clawson CC. The surface-connected canalicular system of blood platelets-a fenestrated membrane system. Am J Pathol. 1980;101:353-64.
- Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. Physiol Rev. 1982;62:185-261.
- 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.
- 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.
- Vaskina EA, Tsirendorzhev DD, Demina LM. Rol neytrofilov i prooksidantnogo potentsiala krovi v razvitii endotelialnoy disfunktsii pri arterialnoy gipertenzii [Role of neutrophils and pro-oxidant capacity of the blood in the development of endothelial dysfunction in hypertension]. Bulletin SO RAMN. 2003;2:107-12. Russian.
- Medvedev IV, Kumova TA. Oslablenie agregatsionnoy sposobnosti trombositov u bolnykh arterialnoy gipertoniey pri metabolicheskom sindrome na fone lozartana. [Weakening aggregability platelets in hypertensive patients with metabolic syndrome on a background of losartan]. Russ J Cardiol. 2008;5:53-5. Russian.
- Sawatzke CL, Solomons CC. Fixation and embedding of small volumes of platelets for transmission electron microscopy. J Clin Pathol. 1980;33(6):600-2.
- 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.

Твердохлеб И.В., Перцева Н.О., Турлюн Т.С. Динамика морфологических изменений гранул тромбоцитов у больных артериальной гипертензией с высоким кардиоваскулярным риском при применении лозартана калия.

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-го 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 гипертония, сахарный диабет 2-го типа, гранулы тромбоцитов, ультраструктура, лозартан.