

Морфофункціональна характеристика тромбоцитів у хворих з рефрактерними тахіаритміями

С помощью современных методик люминесцентной и электронной микроскопии изучены морфофункциональные и цитохимические особенности тромбоцитов периферической крови больных пароксизмальными тахикардиями, рефрактерными к лечению антиаритмическими препаратами. В мазках крови пациентов подсчитывали неактивированные, активированные дегранулированные тромбоциты и их агрегаты. Электронно-цитохимически определяли концентрацию некомпенсированных отрицательных зарядов в гликокаликсе, активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, моноаминоксидазы, аморфометрически — среднее число α -гранул. У больных рефрактерными тахикардиями существенно изменялось морфофункциональное состояние тромбоцитов: увеличивалось число необратимоактивированных и дегранулированных форм, происходила модификация гликокаликса, что позволяет считать обнаруженные нарушения важным компонентом в патогенезе резистентности к лечению. Мера чувствительности больных к медикаментозной терапии коррелирует с изменением значений показателей, характеризующих поверхность и ультраструктуру тромбоцитов, число свободно циркулирующих тромбоцитарных комплексов. При этом ограничивается депонирующая функция тромбоцитов. Реактивность кровяных пластинок также изменена в связи с появлением на их поверхности аморфных отложений, которые защищают или блокируют рецепторы клеток.

Вступ

Останнім часом у кардіології почали більше приділяти уваги вивченню рефрактерних тахіаритмій (РТА), причини та механізми розвитку яких і шляхи їх подолання не встановлено. Йдеться про розвиток стану резистентності хворих з тахіаритміями до раніше вживаних антиаритмічних препаратів (ААП). У попередніх наших дослідженнях виявлено роль клітинних мембран у формуванні резистентності хворих до лікування ААП [2, 3, 8, 9, 11]. У зв'язку з цим ми взяли собі за мету вивчити морфофункціональні та цитохімічні особливості тромбоцитів периферичної крові у хворих із РТА як моделей клітин і «органів накоплення» біологічно активних речовин, насамперед катехоламінів і гістаміну, які вивільняються за відповідних умов і відіграють важливу роль в аритмогенезі [1, 10, 12, 13]. Стресові ситуації в експерименті супроводжувалися порушеннями функції тромбоцитів, що в свою чергу сприяло виникненню аритмій [7, 14].

Методика

Морфофункціональний стан тромбоцитів периферичної крові досліджували за допомогою люмінесцентної й електронної мікроскопії. Для люмінесцентного дослідження використовували вітальне фарбування тромбо-

цитів у збагаченій або цитратній плазмі флюоресцентним барвником акридиновим оранжевим з наступною фіксацією і приготуванням мазків, які вивчали за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2 з використанням збуджуючого світлофільтра УФС-6 і запираючого світлофільтра [6]. Підраховували неактивовані, активовані, дегранульовані тромбоцити та їх агрегати при збільшенні у 400 разів в 13—30 полях зору в кожному мазку, одержаному методом випадкового відбору, з наступним розрахунком відсоткового вмісту функціональних класів тромбоцитів.

Для електронно-мікроскопічних досліджень збагачену тромбоцитами цитратну плазму з 0,4 %-вим розчином глютаральдегіду центрифугували 10 хв при 3 000 об/хв. Осад формених елементів крові додатково фіксували 1 %-вим забуференим розчином окису осмію, обезводжували і вкладали в епон за стандартним прописом. Ультратонкі зрізи одержували на приладі ZKB-8800 (Швеція), контрастували в уранілацетаті свинцю, вивчали і фотографували в електронному мікроскопі ЭМ-125.

Електронногістохімічно визначали концентрацію некомпенсованих від'ємних зарядів у глікокаліксі (реакція зв'язування феризоллю за Ветцелем), активність аденілатциклази (за Райхом з співавт.), фосфодіестерази циклічних нуклеотидів (за Флоренсом із співавт.), моноамінооксидази (за Бодлом і Блушвем) [4], аморфометрично — середній вміст α -гранул на одну пластинку в ультратонкому зрізі.

Хворі з РТА до терапії (21 чоловік) склали 1-у дослідну групу, 2-у групу (12 чоловік), — чутливі до ААП, контрольну групу (5 чоловік) — практично здорові люди. Групу хворих з РТА за основними захворюваннями поділили на 2 підгрупи: хворі на міокардичний кардіосклероз (11 чоловік) і підгрупу хворих на ішемічну хворобу серця (10 чоловік). Хворих 2-ї групи розділили порівну по 6 осіб у кожній підгрупі.

Результати та їх обговорення

Дослідження тромбоцитів, виконані з використанням сучасних морфологічних тестів, свідчать про значні зміни структури і функції кров'яних пластинок, що істотно відрізняються у хворих з різною чутливістю до медикаментозного лікування. За тромбоцитарною формулою, складеною на підставі електронно-мікроскопічних даних, які відображають насамперед функціональний стан циркулюючих у крові тромбоцитів, вірогідно відбувається зміна тромбоцитарного складу у бік активованих форм за рахунок інтактних пластинок і зростає доля дегранульованих елементів (табл. 1). Зросла агрегаційна здатність тромбоцитів, про що свідчить збільшення кількості тромбоцитарних комплексів у крові ($P < 0,05$). При порівнянні тромбоцитограм хворих з тахіаритміями залежно від чутливості до ААП у пацієнтів з РТА виявлено збільшення числа незворотно активованих тромбоцитів, тоді як у чутливих хворих основну масу становили неактивовані пластинки. З розвитком рефрактерності хворих до ААП вихідна схильність неактивованих пластинок до активування вірогідно зростає.

При вивченні глікокаліксу відзначали зменшення концентрації некомпенсованих від'ємних зарядів майже у 2 рази ($P < 0,05$) у хворих з РТА, що свідчить про підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів. Відзначено тенденцію до зменшення вмісту α -гранул у тромбоцитах, але при цьому їх електронна щільність не змінювалась. Зіставлення електронно- і люмінесцентно-мікроскопічних даних тромбоцитарної формули підтверджує підвищення реактивності тромбоцитів у хворих з РТА. Встановлений факт

Таблиця 1. Показники морфофункціонального стану тромбоцитів у хворих із пароксизмальними тахіаритміями

Показник	Група обстежених людей		
	Здорові донори, контрольна група	Рефрактерні, 1-а дослідна група	Чутливі, 2-а дослідна група
Люмінесцентна мікроскопія			
Неактивовані, %	80±6,7	50±2,9**	56±4,0**
Активовані, %	15±1,3	23±2,5**	29±4,5**
Дегранульовані, %	5±0,4	18±3,3**	17±2,1**
Агрегати, ум. од	0	5,2±0,6**	2,5±0,8**
Електронна мікроскопія			
Неактивовані, %	78±1,7	55±1,4*,**	62±2,7**
Зворотньоактивовані, %	12±1,7	17±3,5**	16±1,9**
Незворотньоактивовані, %	8±1,1	2±1,1*,**	16±1,9**
Дегранульовані, %	2±0,2	10±1,2**	7,6±1,0**
Неактивовані й зворотньоактивовані, %	90±2,3	73±2,0**	79±6,6
Незворотньоактивовані й дегранульовані, %	10±0,9	31±2,0*,**	23±2,4**
Тромбоцитарні комплекси, ум. од	5,2±0,6	9,8±0,6*,**	7,7±0,9**
зі зворотньоактивованими	68±8,4	34±3,8*,**	90±6,1**
з незворотньоактивованими	17±2,9	40±3,4*,**	30±4,3
Заряд, ум. од	4,06±0,19	2,39±0,07**	2,96±0,08**
Кількість α -гранул, ум. од	10,1±2,73	8,0±0,7	9,6±0,9
Електронна щільність гранул, ум. од	3,0±0,2	3,0±0,1	3,0±0,3

* Статистична достовірність порівняно з 2-ю дослідною групою; ** статистична достовірність порівняно з контрольною групою.

можна розглядати як результат взаємодії тромбоцитів зі зміненими морфофункціональними властивостями з циркулюючими імунними комплексами в крові, гормональними регуляторними субстанціями, продуктами пероксидації ліпідів, які відіграють важливу роль у патогенезі рефрактерності хворих до лікування ААП [2,3,8,9,11]. Зміна електронної щільності глікокаліксу, його зональні ущільнення і перерозподіл некомпенсованих від'ємних зарядів пов'язані зі зміною функції рецепторного апарату, локалізованого в цитолемі тромбоцитів.

Морфологічно активування тромбоцитів здійснювалось у такі дві фази: зворотну і незворотну. Перша характеризувалася конформаційними переміщеннями в глікокаліксі й плазмолемі, деякими змінами їх рельєфу, зменшенням електронної щільності частини α -гранул. Уже у цій фазі змінювалася здатність до захоплення й кумуляції біологічно активних речовин, що відобразилось на електронній щільності α -гранул й іншому характері світіння зв'язаного з ними люмінесцентного зонда. В апікальних відділах псевдоподій, які деформували поверхню тромбоцитів, глікокалікс був розрідженим. Завершує активацію тромбоцитів їх дегрануляція і деструкція глікокаліксу. При зворотній реакції звільнення відбувались і інші зміни ультраструктури тромбоцитів: зменшенням середнього вмісту в них α -гранул та їх електронної щільності.

Деструктивні зміни глікокаліксу у хворих з РТА сприяють комплексуванню тромбоцитів, які є вже незворотними [5]. У більшості спостережень вивчення ультраструктури оболонки тромбоцитів і використання тесту з феризолем свідчить про істотну перебудову глікокаліксу основної маси тромбоцитів, зменшення від'ємного заряду на їх поверхні.

Конформаційні зміни глікокаліксу є фоном для глибшої перебудови. В окремих випадках з'являються локальні пошкодження глікокаліксу неактивованих тромбоцитів (табл. 2). У результаті оголюється цитолема і тромбоцити стають доступною мішенню для біологічно активних субстанцій, які циркулюють у хворих з тахіаритміями у надмірних кількостях [9, 11]. Крім того, у частини хворих на поверхні тромбоцитів з'явилися пухкі відкладання, які не реагують з феризолем. Вони утворюють «локальні» де-

Таблиця 2. Зміни глікокаліксу тромбоцитів і активності внутрішньоклітинних ферментів у хворих із пароксизмальними тахіаритміями

Показник	Група обстежених людей		
	Здорові донори, контрольна група	Рефрактерні, 1-а дослідна група	Чутливі, 2-а дослідна група
Морфологічний стан, % вихідного	60	—	—
без змін			
поверхневі конформативні зміни	40	18,5	53
глибокі конформативні зміни	—	38,7	15
вогнищева дисоціація	—	18,5	12
«локальні депозити»	—	10,5	—
«екранування»	—	33,8	20
Активність ферментів, ум. од			
аденілатциклази	2,1±0,19	2,9±0,16	2,7±0,08
фосфодіестерази	1,7±0,19	3,7±0,19*,**	2,8±0,22**
моноамінооксидази	2,0±0,19	2,9±0,08**	2,7±0,27**

позити на обмеженій поверхні пластинки або покривають її всю, ізолюючи від оточення. Функціональна реакція «екранованих» пластинок залежить від якості нашарованого на глікокалікс матеріалу. В одних випадках це є відносно індиферентні речовини, в інших — імунні або ліпопротеїдні комплекси, які стимулюють тромбоцити і викликають їх агрегацію [11]. При контактах з субстратами, стимулюючими тромбоцити, вони реагують уже на порівняно невеликі за площею атипіві нашарування на своїй поверхні. При накладанні на пошкоджений глікокалікс відносно інертних субстанцій реактивність тромбоцитів залишалася фоновією для конкретного спостереження. Разом з тим, як видно з табл. 1, число тромбоцитарних комплексів, що циркулюють у рефрактерних хворих, збільшене вдвічі ($P<0,01$), порівняно з таким у людей контрольної групи, у той час як у чутливих до лікування хворих — 1,5 рази ($P<0,05$). І якщо у останніх вона утворена в основному із зворотноактивованих елементів, то у рефрактерних хворих переважають незворотноактивовані тромбоцити. Можна вважати, що таке комплексування тромбоцитів є пасивним процесом, зумовленим «екрануванням» глікокаліксу зі зниженням поверхневого від'ємного заряду пластинок.

При аналізі стану глікокаліксу тромбоцитів, який здійснює значний вплив на їх функцію, виявлено істотні зміни в обох групах хворих. У обстежених з високою ефективністю антиаритмічної терапії в глікокаліксі у 53 % спостережень відзначались лише поверхневі конформаційні зміни, тоді як глибока деструкція або накладання атипичних субстанцій (екранування), яке не спостерігається у чутливих хворих, виявлено у 20 % випадків з РТА. Під час розвитку рефрактерності до лікування поверхневі конформаційні зміни в глікокаліксі спостерігались рідше ніж в 3 рази, а деструктивні явища аж до вогнищевої дисоціації становили 57,2 % усіх спостережень. Збільшилося відносне число випадків екранування тромбоцитів до 33,8 % порівняно з чутливими до ААП хворими. У хворих з РТА в 10,5 % випадків на поверхні тромбоцитів знайдено локальні депозити, можливо, зумовлені накладанням на поверхню тромбоцитів імунних комплексів або продуктів деградації фібрину.

При зіставленні всіх електронно-мікроскопічних та люмінесцентних досліджень дестабілізація кров'яних пластинок і дегрануляція найбільше виражені при глибоких конформаційних змінах і появі на поверхні тромбоцитів білкових депозитів.

Хронічний дестабілізуючий вплив, здійснюваний на тромбоцити збільшенням вмісту в їх мембранах і сироватці крові продуктів пероксидації ліпідів [3, 9, 11], призводить до зростання в них активності аденілатциклази і фосфодіестерази. При чому в обох групах міра підвищення активності аденілатциклази приблизно однакова, тоді як у рефрактерних пацієнтів активність фосфодіестерази збільшувалася більш ніж у 2 рази ($P < 0,01$). Слід зауважити, що у хворих з РТА різко підвищилась гетерогенність тромбоцитів за активністю аденілатциклази. У значній кількості випадків (30 %) зустрічались кров'яні пластинки з різко пригніченою активністю ензиму і одночасно високою активністю (іноді більше ніж у 2 рази порівняно з чутливими хворими, $P < 0,05$) активності фосфодіестерази, метаболізуючої цАМФ. При цьому тромбоцити з високою активністю фосфодіестерази виявлено не тільки серед активованих, а і серед неактивованих форм, що свідчить про потенціально високу реактивність кров'яних пластинок. Якщо проникливість поверхневої мембрани для кальцію регулюється медіаторами через систему аденілатциклази внаслідок утворення цАМФ і цГМФ і активації цАМФ-залежних протеїніназ, фосфорилюючих і дефосфорилюючих клітинні мембрани, то зрозумілим є збільшення активності аденілатциклази і фосфодіестерази у хворих з РТА і корелюючі з ними зміни кількості внутрішньоклітинного кальцію (відповідно $r = 0,64$, $P < 0,05$ для першої і $r = 0,75$, $P < 0,05$ для другого) [9], який відіграє важливу роль у виникненні електричної нестабільності міокарда.

У рефрактерних до лікування хворих порушена і гемостатична функція тромбоцитів. Помітну тенденцію до зменшення середньої кількості α -гранул в тромбоцитах відзначено лише при РТА. При цьому вміст α -гранул був неоднорідним. Поряд з описаними змінами, що свідчать про порушення процесів депонування і виділення біологічно активних речовин, у тромбоцитах відзначено більше пригнічення активності моноаміноксидази, метаболізуючої біогенні зміни.

Отже, при РТА істотно змінюється стан тромбоцитів, що дозволяє розглядати виявлені порушення як важливий компонент патогенезу цього захворювання. Про це свідчать корегуючі зі ступенем чутливості хворих до медикаментозної терапії зміни поверхні й ультраструктури тромбоцитів, присутність в крові вільноциркулюючих тромбоцитарних комплексів

($r=0,68$, $P<0,05$). Знайдений новий взаємозв'язок між станом поверхні тромбоцитів і їх агрегаційною здатністю у хворих РТА. Сприятливими факторами асоціації тромбоцитів є зменшення концентрації і перерозподіл некомпенсованих від'ємних зарядів у глікокаліксі. Підвищилася гетерогенність α -гранул, що вказує на обмеження депонуючої функції тромбоцитів або втрату ними біологічно активних речовин по типу зворотної реакції вивільнення. Найменш сприятливий її тип пов'язаний з появою вогнищ дисоціації і оголенням цитолемі, в результаті чого активність таких тромбоцитів різко зростає. У хворих з РТА виявлений тип морфофункціональної перебудови, пов'язаний з появою на поверхні тромбоцитів аморфних відкладень, що також змінює їх реактивність. Захищаючи чи блокуючи рецептори тромбоцитів, ці слабоосміофільні маси зменшують чутливість клітин до впливів ААП.

Таким чином, у хворих з РТА виявлено зростання долі зворотно-, незворотноактивованих і дегранульованих тромбоцитів, що корелює зі ступенем рефрактерності хворих до лікування медикаментозними посередниками. Модифікація глікокаліксу, поява на його поверхні локальних депозитів пов'язана з порушеннями ліпідного обміну й імунного гомеостазу [2, 8, 9, 11].

V.A.Bobrov, A.S.Gavrish, I.G.Kupnovitskaya

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF THROMBOCYTES IN PATIENTS WITH REFRACTORY TACHYARRHYTHMIAS

Morphological and cytochemical features of peripheral blood thrombocytes from patients with paroxysmal tachyarrhythmias refractory to treatment with antiarrhythmic drugs were studied using modern techniques of fluorescence and electron microscopy. Blood samples of 33 patients were analyzed, 21 of them being refractory to treatment. Blood samples of 5 healthy persons served as controls. Nonactivated, activated, degranulated thrombocytes and their aggregates were counted in blood smears. Concentration of noncompensated negative charges in glycocalyx and activity of adenylate cyclase, phosphodiesterase of cyclic nucleotides and monoamine oxidase were determined by ultrastructural histochemistry techniques and mean content of α -granules was determined morphometrically. The morphofunctional state of thrombocytes in patients with refractory tachyarrhythmias was found to change significantly resulting in an increase in the number of irreversibly activated and degranulated forms and glycocalyx modification. These changes are supposed to represent an important component of the pathogenesis of resistance to drug treatment. The level of patients' sensitivity to the drug therapy correlates with the parameters under study indicative of changes in the thrombocyte surface and ultrastructure and of the number of free-circulating thrombocyte complexes. Under these conditions the deposition function of thrombocytes is restricted. The reactivity of platelets is also changed due to appearance of amorphous deposits on their surfaces which either protect or block the receptors of the cells.

Academician Strazhesko Research Institute of Cardiology,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабушкина Г.В., Мухамедьярова Р.М. Гемодинамические показатели у больных ишемической болезнью сердца на фоне курсовой лазеротерапии // Радионуклидные исследования в кардиологии: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. — М., 1991. — 35 с.
2. Бобров В.О., Купновицька І.Г. Рефрактерні тахіаритмії та шляхи їх подолання методами квантової гемотерапії // 4-й конгр. світової федерації українських лікарських товариств. Тези допов. — Харків, 1992. — С. 133—134.
3. Бобров В.О., Мхітарян Л.С., Купновицька й ін. Стан клітинних мембран у хворих з рефрактерними тахіаритміями на фоні некоронарогенних захворювань міокарда // XIII з'їзд кардіологів і терапевтів України. Тези допов. — Ч. I. — К., 1992. — 100 с.
4. Васильева Е.Ю. Морфологические типы тромбоцитов здоровых людей // Современные проблемы сердечно-сосудистой патологии. — М.: Наука, 1982. — С. 37—39.
5. Гавриш А.С., Порадун Е.Н., Иващенко Т.И. и др. Морфология и реактивность тромбоцитов в условиях коронарной недостаточности // Применение электронной микроскопии в медицине. — К., 1992. — 11 с.