

О.С. Гавриш
О.В. Сергієнко
Г.Ф. Клубова
О.Л. Кіндзерська

Інститут кардіології, Київ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ ТРОМБОЦИТІВ У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

Ключові слова: ревматоїдний артрит, тромбоцити, люмінесцентна мікроскопія, електронна мікроскопія.

Резюме. Досліджено ультраструктурні та цитохімічні особливості тромбоцитів у 29 хворих на ревматоїдний артрит (РА) залежно від активності імунзапального процесу. Електронно-цитохімічними методами визначали аніонні групи глікокаліксу, концентрацію іонів кальцію, активність аденілатциклази, фосфодіестерази циклічних нуклеотидів. Відзначено вірогідне підвищення реактивності та зміни структури кров'яних пластинок у хворих на РА. Активація тромбоцитів поєднується з посиленням млявого перебігу екзоцитозу, альтерацією окремих тромбоцитів з явищами парціального некрозу цитоплазми. Характерними змінами ультраструктури кров'яних пластинок є пошкодження глікокаліксу зі зниженням концентрації аніонних груп, активності аденілатциклази та зв'язування іонів кальцію в зонах деструкції глікокаліксу. Високу активність фосфодіестерази циклічних нуклеотидів виявлено найчастіше в активованих тромбоцитах. Відзначена тенденція до більш істотної активації кров'яних пластинок у хворих з імунзапальним процесом II ступеня активності.

Ревматичні хвороби належать до категорії найбільш поширених системних уражень сполучної тканини (Насонова В.А., 1997). В патогенезі хвороб цієї групи значну роль, поряд з імунним дисбалансом, відіграють пошкодження мікроциркуляції та гемореології (Дормедонтов Е.Н. і соавт., 1985). Особливу увагу в останні роки привертають дані щодо можливої ролі активації системи зсідання крові у загостренні імунзапального процесу при ревматичних захворюваннях (Талыбов Ф.Ю. і соавт., 1994). Отже, актуальність дослідження ультраструктурних та цитохімічних особливостей тромбоцитів у хворих на ревматоїдний артрит (РА) залежно від активності імунзапального процесу не викликає сумніву.

Обстежені 29 хворих на РА (основна група) та 10 практично здорових донорів (контрольна група). Обстежені обох груп були рандомізовані за віком і статтю. Серед хворих на РА жінок було 20 (69%), чоловіків - 9 (31%). В середньому вік хворих становив $44,4 \pm 5,5$ року. Активність РА I ступеня встановлено в 11 (38%) хворих, II ступеня - у 18 (62%); серопозитивний варіант - у 14 (48%), серонегативний - у 15 (52%). Швидкопрогресуючий перебіг захворювання відзначено у 6 (20,7%) пацієнтів, а повільнопрогресуючий - у 23 (79,3%); системні прояви РА (аміотрофія ревматоїдних вузликів) - у 14 (48%), причому у 71,4% з них пов'язані із негативним варіантом РА.

Досліджували тромбоцити, виділені із крові, взятої з ліктьової вени з дотриманням вимог, що забезпечують мінімальну активацію кров'яних пластинок (Sixma J. et al., 1972; Петров М.Н. і соавт., 1975; Васильєва Е.Ю., 1982). Для виконання люмінесцентної мікроскопії використовували суправітальне забарвлення тромбоцитів у збагаченій ними

цитратній плазмі флуоресцентним барвником акридиновим жовтогарячим з наступною фіксацією (Ладный А.И. і соавт., 1988). Кількість неактивованих, активованих, дегранульованих кров'яних пластинок та їх агрегатів підраховували при збільшенні у 400 разів у 10–30 полях зору.

Для електронно-мікроскопічного та цитохімічного дослідження тромбоцити виділяли шляхом центрифугування крові з 0,4% розчином глутаральдегіду або 1% розчином параформальдегіду при 1000 об/хв протягом 15 хв, а потім повторного центрифугування збагаченої тромбоцитами плазми крові при 3000 об/хв протягом 15 хв. У виділених у такий спосіб кров'яних пластинках визначали розподіл глікозаміногліканів (ГАГ) і концентрацію негативних зарядів у глікокаліксі (реакція зв'язування феризолію за Б. Ветцелем), активність та локалізацію аденілатциклази (АЦ), фосфодіестерази (ФДЕ) циклічних нуклеотидів (за Флоренком, Барнеттом і Грингардом) (Гайер Г., 1974); концентрацію іонів кальцію - за допомогою реакції з нафтолгідраламіном (НГА) (Zechmeister A.A., 1979).

Після проведення цитохімічних реакцій матеріал додатково фіксували 1% розчином тетраоксиду осмію, обезводнювали та вміщували в епоксидні смоли. Ультратонкі зрізи, отримані на ультратомі LKB-8800, неконтрастовані та контрастовані уранілацетатом і цитратом свинцю, досліджували на електронному мікроскопі ПЕМ-125К.

Беручи за основу існуючі уявлення про морфологічні типи кров'яних пластинок, які відображають їх функціональний стан, визначали співвідношення різних функціональних класів тромбоцитів (ФКТ): неактивованих (спочиваючих), оборотно- та необоротноактивованих, дегранульованих, агрегованих, а також мегатромбоцитів. Підраховували

середній вміст у кров'яних пластинках а-гранул і щільних тілець. Дані морфометричного дослідження обробляли статистично, визначали середні арифметичні значення виборок, їхні середньоквадратичні похибки та довірчі інтервали.

Результати досліджень свідчили про суттєві зміни реактивності та морфофункціонального стану кров'яних пластинок у хворих на РА. За даними люмінесцентної мікроскопії кількість неактивованих тромбоцитів знижується на 53,64%, а вміст активованих, дегранульованих та агрегованих кров'яних пластинок підвищується відповідно на 45,37; 4,93 та 3,43%, що свідчить про значне зростання реактивності тромбоцитів (таблиця).

Під час аналізу електронно-мікроскопічних тромбоцитогам виявлено зменшення у периферичній крові числа неактивованих тромбоцитів на 48,94%, збільшення кількості оборотно- та необоротно-активованих - на 11,66 та 9,21% відповідно, дегранульованих - на 23,56%, оборотно- та необоротноагрегованих кров'яних пластинок - на 14,47 та 3,65% відповідно (див. табл. 1).

Хронічне подразнення тромбоцитів на фоні зростання їх реактивності зумовлює значний поліморфізм пластинок: розбіжності їх розмірів, форми та електронної щільності цитоплазматичного матриксу, а також появу ознак млявого екзоцитозу - дилатації елементів поверхнево-зв'язаної вакуолярної системи (ПЗВС) з наявністю в них осміофільного матеріалу та мало змінених а-гранул.

Поряд з цим, значно збільшується кількість кров'яних пластинок з ознаками альтеративних змін органел та явищами парціального некрозу. Однією з імовірних причин цього є недостатність енергетичного забезпечення функції тромбоцитів, про що свідчать ознаки ушкодження мітохондрій: надмірне набрякання, гомогенізація та лізис малочисленних крист, а також зниження вмісту глікогену в цитоплазмі кров'яних пластинок, які є основним джерелом енергетичного забезпечення їх функцій.

Характерними змінами ультраструктури тромбоцитів була перебудова глікокаліксу зі значними коливаннями його електронної щільності, поява осередків його рарифікації з оголенням плазмолем. Концентрація некомпенсованих негативних зарядів в цих кров'яних пластинках знижувалася зі значним зростанням гетерогенності їх розподілу. Поряд з деструктивними змінами глікокаліксу в частині тромбоцитів відзначено нашарування пухких слабоосміофільних відкладень, що не реагують з колоїдним залізом, або поява локальних депозитів аналогічного вигляду. З перебудовою глікокаліксу, можливо, пов'язане виявлене нами значне нерівномірне зниження активності АЦ з коливанням розподілу осаду в плазмолемі як у межах одного тромбоцита, так і в різних кров'яних пластинках. Зв'язування Ca^{2+} в зонах альтерації глікокаліксу різко послаблене, а на мембранних структурах ПЗВС та а-гранул - високе.

Кількість а-гранул та щільних тілець у ФКТ помітно зменшена, в середньому - на 5,51 органели у перерахунку на одну кров'яну пластинку, їх елект-

ронна щільність знижена, що дає змогу зробити висновок про послаблення здатності тромбоцитів до накопичення біологічно активних речовин.

Активність ФДЕ, що катаболізує цАМФ, підвищена, продукт гістохімічної реакції з виявленням ФДЕ, на відміну від контрольних спостережень, брилоподібного вигляду, а його вміст в активованих пластинках значно вищий, ніж в неактивованих. Все це свідчить про дисбаланс вторинних провісників, що значною мірою пояснює гіперреактивність тромбоцитів у хворих на РА.

Пов'язана з підвищенням чутливості кров'яних пластинок до різноманітних активуючих впливів їх елімінація із кровообігу значно підвищується, що призводить до збільшення в периферичній крові кількості мегаформ, частково агрегованих зі зрілими ФКТ, що свідчать про неспроможність адаптивних механізмів організму повноцінно компенсувати елімінацію загиблих тромбоцитів.

Порівняння морфофункціонального стану кров'яних пластинок у хворих на РА залежно від ступеня його активності не виявило суттєвих розбіжностей показників реактивності тромбоцитів та цитохімічного дослідження. За попередніми даними, відзначено лише тенденцію до більш вираженого посилення реактивності кров'яних пластинок у хворих на РА II ступеня активності за даними люмінесцентно-мікроскопічних тромбоцитогам.

Отже, за отриманими результатами, порушення функції кров'яних пластинок у хворих на РА передусім зумовлене перебудовою глікокаліксу, плазмолемі і дисфункцією розташованого тут рецепторного апарату, дисбалансом в роботі функціонально-асоційованих з ним ферментних систем, таких, наприклад, як досліджені нами АЦ і ФДЕ.

Таблиця
Ультраструктурні та люмінесцентно-мікроскопічні показники тромбоцитів у хворих на РА залежно від ступеня його активності

Показник	Донори	Хворі на РА I ступеня активності	Хворі на РА II ступеня активності	Хворі на РА
Електронна мікроскопія				
Неактивовані, %	78,0±9,0	27,38±5,00	30,03±8,40	29,06±7,19
Активовані оборотно, %	16,0±1,0	28,73±9,43	27,06±5,46	27,66±6,73
Активовані необоротно, %	7,8±1,1	18,60±1,53	16,10±5,65	17,01±4,63
Дегранульовані, %	2,2±0,2	25,25±8,94	26,09±4,57	25,78±6,06
Агреговані оборотно, %	3,9±0,2	20,83±8,32	16,97±14,58	18,37±12,33
Агреговані необоротно, %	7,3±0,2	10,85±7,50	9,93±8,32	10,26±7,66
Кількість α-гранул (у перерахунку на один тромбоцит)	10,1±2,9	6,89±2,54	6,44±1,48	6,61±1,82
Люмінесцентна мікроскопія				
Неактивовані, %	78,0±2,0	29,50±6,43	19,80±4,49	24,35±7,52
Активовані, %	16,0±1,0	53,80±13,38	68,71±4,59	61,37±12,50
Дегранульовані, %	6,0±1,0	13,00±14,69	8,09±4,05	10,93±9,32
Агреговані, %	0	3,70±3,52	3,54±3,05	3,43±2,97

ЛІТЕРАТУРА

Васильєва Е.Ю. (1982) Морфологические типы тромбоцитов здоровых людей. В кн.: Современные проблемы сердечно-сосудистой патологии. Москва, с. 37-39.
 Гайер Г. (1974) Электронная гистохимия (Пер. с англ.). Мир, Москва, 488 с.
 Дормедонтов ЕН, Фризен БН, Семин ВА и др. (1985) Оценка состояния микроциркуляции, реологических свойств крови у боль-

ных ревматоидным артритом с системными проявлениями. Ревматология, 4: 10–13.

Ладный А.И., Кондаков И.К., Ермакович И.И. (1988) Экспресс-метод оценки морфофункционального состояния тромбоцитов. Лаб. дело, 2: 27–29.

Насонова В.А. (1997) Ревматические болезни. Руководство по внутренним болезням. Медицина, Москва, 519 с.

Петров М.Н., Вашкинель В.К., Алмазов В.А. (1975) О значении способа фиксации кровяных пластинок для оценки тромбоцитарной формулы. Лаб. дело, 1: 22–26.

Тальбов Ф.Ю., Кубанцева Н.В., Дубровина Н.А. (1994) Лабораторная диагностика синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания у больных ревматоидным артритом. Клин. медицина, 4: 25–28.

Sigma J., Linssien W., Geuze H. (1972) Glutaraldehyde fixation of human blood platelets. Tromb. Diath. Haemorr., 27: 272–277.

Zechmeister A.A. (1979) A new selective ultrahistochemical method for the demonstration of calcium using N,N'-naphtholylhydroxylamine. Histochem., 61(2): 229–239.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

**А.С. Гавриш, О.В. Сергиенко,
А.Ф. Клубова, О.Л. Киндзерская**

Резюме. Исследовали ультраструктурные и цитохимические особенности тромбоцитов у 29 больных с ревматоидным артритом (РА) в зависимости от степени активности аутоиммунного процесса. Электронно-цитохимическими методами выявляли анионные группы гликокаликса, концентрацию ионов кальция, активность аденилатциклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Отмечено достоверное повышение реактивности и изменения структуры кровяных пластинок у больных РА. Активация тромбоцитов сочетается с усилением вялотекущего экзоцитоза, альтерацией части тромбоцитов с явлениями парциального некроза цитоплазмы. Характерными изменениями ультраструктуры кровяных пластинок является повреждение гликокаликса со снижением концентрации анионных групп, активности аденилатциклазы и связывания ионов кальция в зонах деструкции гликокаликса. Высокая активность фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов выявлена преимущественно в активи-

рованных тромбоцитах. Отмечена тенденция к более значительной активации кровяных пластинок у больных с иммуновоспалительным процессом II степени активности.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, тромбоциты, люминесцентная микроскопия, электронная микроскопия.

THE MORPHOFUNCTIONAL PARTICULARITIES OF THROMBOCYTES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

**O.S. Gavrish, O.V. Sergienko,
G.F. Klubova, O.L. Kyndzersky**

Summary. We studied ultrastructural and cytochemical particularities of thrombocytes in 29 patients with active rheumatoid arthritis. Using electronic-cytochemical method we examined anions of glycolyx, calcium ions, adenylatcyclase and phosphodiesterase activity cyclic nucleotide. Significant increase of platelets' reactivity and changes of platelets' structure in patients with rheumatoid arthritis were demonstrated. The thrombocytes activation was combined with increase of flaccid exocytosis, alteration of some part of thrombocytes and partial cytoplasmic necrosis. The typical ultrastructural changes of thrombocytes in patients with rheumatoid arthritis were glycolyx destruction, decrease of anion groups concentration and adenylatcyclase activity as well as calcium ion deflection in sites of glycolyx destruction. The high phosphodiesterase activity of cyclic nucleotides was found mainly in activated thrombocytes. Tendency of more thrombocytes activation was revealed in patients with II degree of activity of autoimmune process.

Key words: rheumatoid arthritis, thrombocytes, luminescence electronic microscopy.

Адреса для листування:

Клубова Ганна Федорівна
03151, Київ, вул. Народного ополчення, 5
Інститут кардіології ім. М.Д. Стражеска
АМН України, відділ некоронарогенних
захворювань і клінічної ревматології

РЕФЕРАТИВНА ІНФОРМАЦІЯ

Применение нестабильных форм кислорода для коррекции иммунного статуса у больных с деформирующим артрозом

Измалков С.Н., Ларцев Ю.В. (1998) *Int. J. Immunorehabil.*, 8: 139.

Учитывая иммунные реакции, происходящие в тканях сустава, необходимы изменения комплексного подхода к лечению больных с деформирующим артрозом, включающего воздействие на все основные звенья патологического процесса. В комплексе лечебных мероприятий одна из основных ролей принадлежит оксигенотерапии, как общей, так и местной. Мы вводили в сустав кисло-

род в форме нестабильных, биологически активных его радикалов – синглетный кислород, озон. В нестабильном состоянии кислород обладает высоким коэффициентом диффузии, повышенной химической активностью, способностью проникать через мембрану клетки, подавляя воспаление посредством связывания антител. Результаты экспериментальных исследований с использованием общеморфологических, гистохимических, иммунологических и морфометрических методов с последующим математическим моделированием изученных процессов подтверждают целесообразность применения этого способа лечения.