

В.Н. Коваленко¹
 А.С. Гавриш¹
 Н.М. Гулай²
 О.В. Сергиенко¹
 А.Ф. Клубова¹
 О.Л. Кицзерская¹
 А.В. Коцюрuba²
 А.М. Бухачевич²
 Г.В. Косякова²

¹Институт кардиологии, Киев

²Институт биохимии, Киев

УЛЬТРАСТРУКТУРА ТРОМБОЦИТОВ И ДИСФУНКЦИЯ NO-СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Резюме. Исследовали ультраструктурные и цитохимические особенности тромбоцитов и состояние NO-системы у 29 больных с ревматоидным артритом в зависимости от степени активности аутоиммунного процесса. Электронно-цитохимическими методами выявляли анионные группы гликокаликса, ионы кальция, определяли активность аденилциклазы, фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Отмечено повышение реактивности и изменения структуры кровяных пластинок у больных. Активирование тромбоцитов сочеталось 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 аденилциклазы и связывания ионов кальция в участках деструкции гликокаликса. Высокая активность фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов выявлена преимущественно в активированных тромбоцитах. Отмечена тенденция к более значительной активации кровяных пластинок у больных с аутоиммунным процессом II степени активности. По данным биохимических исследований выявлены признаки активации NO-системы, оказывающей дополнительное дестабилизирующее влияние на тромбоциты.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, тромбоциты, NO-система, люминесцентная микроскопия, электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит — одно из наиболее распространенных заболеваний, характеризующихся системным поражением соединительной ткани. В его патогенезе, наряду с иммунным дисбалансом, значительную роль играют поражения микроциркуляции и гемореологии (Дормедонтов Е.Н. и соавт., 1985). В последние годы получены данные о взаимосвязи иммунных сдвигов и активации системы свертывания крови и функции сосудистого эндотелия при обострении ревматоидного артрита (Талыбов Ф.Ю. и соавт., 1994). В связи с этим целесообразность изучения ультраструктурных и цитохимических особенностей тромбоцитов у больных с ревматоидным артритом в зависимости от активности иммуновоспалительного процесса не вызывает сомнений.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 29 больных с ревматоидным артритом (основная группа) и 10 практически здоровых доноров, составивших контрольную группу. Обследованные обеих групп были рандомизированы по возрасту и полу. Возраст больных в среднем составил $44,4 \pm 5,5$ года. Ревматоидный артрит I степени активности диагностирован у 11 (38%), II степени — у 18 (62%) больных. Быстро прогрессирующее течение заболевания отмечено у 6 (20,7%) пациентов, медленно прогрессирующее — у 23 (79,3%). Системные проявления ревматоидного процесса в виде

амиотрофии, ревматоидных узелков выявлены у 14 (48%) больных.

Исследовали тромбоциты, выделенные из крови локтевой вены людей, взятой с учетом требований, обеспечивающих минимальную активацию кровяных пластинок (Sixma J., 1972; Петров М.Н. и соавт., 1975; Васильева Е.Ю., 1982). Для люминесцентной микроскопии использовали суправитальное окрашивание тромбоцитов в обогащенной ими цитратной плазме крови флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым с последующей фиксацией (Ладный А.И. и соавт., 1988).

В кровяных пластинках определяли распределение гликозаминогликанов (ГАГ) и концентрацию отрицательных зарядов в гликокаликсе (реакция связывания ферризоля по В. Ветцелю), активность и локализацию аденилатциклазы (АЦ) (по Райку и соавторам), фосфодиэстеразы (ФДЭ) циклических нуклеотидов (по Флоренко, Барнетту и Грингарду) (Гайер Г., 1974), концентрацию ионов кальция (реакция с НГА) (Zechmeister A.A., 1979).

После проведения цитохимических реакций материал дополнительно фиксировали 1% раствором тетроксидом осмия, обезвоживали и заключали в эпоксидные смолы. Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме LKB-8800, неконтрастированные и контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, исследовали на электронном микроскопе ПЭМ-125К.

В соответствии с представлением о морфологических типах кровяных пластинок, отображаю-

ших их функциональное состояние, определяли соотношение функциональных классов тромбоцитов (ФКТ): неактивированных, обратимо и необратимо активированных, дегранулированных, агрегированных, а также мегатромбоцитов. Определяли среднее содержание в кровяных пластинках α -гранул и плотных телец. Результаты морфометрических исследований обрабатывали статистически.

С помощью биохимических методов в плазме крови и эритроцитах определяли активность NO-синтетазы (колориметрическим методом) (Yan L., 1994) и содержание нитрит-аниона по методу L.C. Green и соавторов (1982) и нитрат-аниона (Bank N.R., Aupedjian H.S., 1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования тромбоцитов с использованием современных морфологических тестов свидетельствуют о значительных изменениях структуры и функции кровяных пластинок, отличающихся в зависимости от активности ревматоидного артрита. По данным люминесцентной микроскопии количество неактивированных тромбоцитов уменьшается на 53,64%, а содержание активированных, дегранулированных и агрегированных кровяных пластинок повышается соответственно на 45,37; 4,93; 3,43%, что свидетельствует о значительном возрастании реактивности тромбоцитов (табл. 1).

В электронно-микроскопической тромбоцитарной формуле, которая, как установлено в исследованиях последних лет, отражает функциональное состояние циркулирующих в крови тромбоцитов, неизменно отмечается сдвиг в сторону обратимо и необратимо активированных форм (на 11,66 и 9,21% соответственно) за счет уменьшения числа интактных пластинок (на 48,94%), возрастает доля элементов, подвергшихся дегрануляции (на 23,56%). Достоверно возрастает агрегационная способность тромбоцитов, о чем свидетельствует увеличение количества тромбоцитарных комплексов в крови (обратимо и необратимо агрегированных тромбоцитов соответственно на 14,47 и 3,65%).

Хроническое раздражение тромбоцитов на фоне повышения их реактивности обуславливает значи-

тельный полиморфизм пластинок: они различны по размеру, форме и электронной плотности цитоплазматического матрикса, отмечаются признаки вялотекущего экзоцитоза в виде дилатации элементов поверхностно-связанной вакуолярной системы (ПВС) с наличием в них осмиофильного материала и мало измененных α -гранул. Обратимая реакция освобождения сочетается с рядом других характерных изменений ультраструктуры тромбоцитов, свидетельствующих о снижении их способности депонировать биологически активные вещества: со снижением среднего содержания в кровяных пластинках α -гранул (в среднем на 5,51) и их электронной плотности.

Наряду с описанными изменениями значительно увеличивается количество кровяных пластинок с признаками альтеративных изменений и явлениями парциального некроза. Одной из возможных причин этого является недостаточность энергетического обеспечения функций тромбоцитов, о чем свидетельствуют признаки повреждения митохондрий: их набухание, гомогенизация и лизис малочисленных крист, а также снижение содержания гликогена в цитоплазме кровяных пластинок.

При анализе состояния гликокаликса тромбоцитов, по современным представлениям в большой степени определяющего их адгезивность и реактивность, у больных основной группы по сравнению с контрольной выявлены существенные изменения его ультраструктуры и значительные колебания электронной плотности. Конформационные изменения гликокаликса служат фоном для его более глубокой перестройки, характеризующейся появлением локальных повреждений, очагов рарификации с обнажением плазмолеммы в сочетании с перераспределением и снижением концентрации некомпенсированных отрицательных зарядов в нем.

Наряду с деструктивными изменениями гликокаликса у части больных на поверхности тромбоцитов появляются рыхлые слабо осмиофильные отложения, не реагирующие с ферризолеом. Они образуют ограниченные по площади «локальные» депозиты на поверхности пластинки либо покрывают ее всю.

Таблица 1
Ультраструктурные и люминесцентно-микроскопические показатели тромбоцитов у больных с ревматоидным артритом (РА) в зависимости от степени активности процесса

Показатель	Доноры	Больные РА I степени активности (n=11)	Больные РА II степени активности (n=18)	Больные РА (n=29)
Электронная микроскопия				
Тромбоциты:				
неактивированные, %	78,0±9,0	27,38±5,00	30,03±8,40	29,06±7,19
активированные обратимо, %	16,0±1,0	28,73±9,43	27,06±5,46	27,66±6,73
активированные необратимо, %	7,8±1,1	18,60±1,53	16,10±5,65	17,01±4,63
дегранулированные, %	2,2±0,2	25,25±8,94	26,09±4,57	25,78±6,06
агрегированные обратимо, %	3,9±0,2	20,83±8,32	16,97±14,58	18,37±12,33
агрегированные необратимо, %	7,3±0,2	10,85±7,50	9,93±8,32	10,26±7,66
Количество α -гранул (в перерасчете на один тромбоцит)	10,1±2,9	6,89±2,54	6,44±1,48	6,61±1,82
Люминесцентная микроскопия				
Тромбоциты:				
неактивированные, %	78,0±2,0	29,50±6,43	19,80±4,49	24,35±7,52
активированные, %	16,0±1,0	53,80±13,38	68,71±4,50	61,37±12,50
дегранулированные, %	6,0±1,0	13,00±14,69	8,09±4,05	10,93±9,32
агрегированные, %	0	3,70±3,52	3,54±3,05	3,43±2,97

С перестройкой гликокаликса, по-видимому, связаны выявленные нами изменения активности АЦ и связывания Ca^{2+} . При этом у больных резко возросла гетерогенность тромбоцитов по активности АЦ, причем в значительном количестве случаев встречаются кровяные пластинки с резко угнетенной активностью энзима. Снижение активности АЦ закономерно сочеталось с нарастанием доли обратимо и необратимо активированных и дегранулированных клеток. Связывание Ca^{2+} в зонах альтерации гликокаликса резко ослаблено, а на мембранных структурах ПВС-системы и α -гранул высокое.

В этих же наблюдениях активность ФДЭ, метаболизующей цАМФ, поддерживалась на высоком уровне, продукт гистохимической реакции при выявлении ФДЭ, в отличие от таковой в контроле, имел глыбчатый характер. При этом следует отметить, что тромбоциты с высокой активностью ФДЭ в значительном количестве обнаруживали не только среди активированных, но и среди неактивированных форм, что свидетельствует о потенциально высокой реактивности кровяных пластинок.

Описанные изменения свидетельствуют о дисбалансе вторичных мессенджеров, что в значительной мере объясняет гиперреактивность тромбоцитов у больных с ревматоидным артритом.

Связанная с повышением чувствительности кровяных пластинок к различным активирующим влияниям их элиминация из кровотока значительно повышается, что приводит к увеличению в периферической крови количества мегаформ, частично агрегированных со зрелыми тромбоцитами различных функциональных классов, что свидетельствует о неспособности адаптационных механизмов организма полноценно компенсировать элиминацию погибших тромбоцитов.

При сравнении морфофункционального состояния кровяных пластинок отмечена лишь тенденция к более выраженному повышению реактивности тромбоцитов у больных с ревматоидным артритом высокой степени активности по данным люминесцентной микроскопии.

Результаты биохимических исследований свидетельствовали о достоверном снижении уровня нитрит-аниона в плазме крови, нитрат-аниона в эритроцитах, повышении содержания нитрат-аниона и активности NO-синтетазы в плазме крови у больных с ревматоидным артритом, что свидетельствует о выраженном дисбалансе NO-системы. Досто-

верно более высокое содержание нитрат-аниона как в эритроцитах, так и в плазме крови отмечено при иммуновоспалительном процессе II степени активности (табл. 2).

ВЫВОДЫ

Таким образом, в соответствии с полученными результатами, нарушение функции кровяных пластинок при ревматоидном артрите в первую очередь связано с перестройкой гликокаликса, плазмолеммы и дисфункцией находящегося тут рецепторного аппарата, дисбалансом в работе функционально ассоциированных с ним ферментных систем, таких, как АЦ и ФДЭ. Установленный эффект можно рассматривать как следствие взаимодействия тромбоцитов, морфофункциональные свойства которых изменены, с гормональными регуляторными субстанциями, продуктами оксидантного стресса и их дестабилизирующим воздействием, оказываемым на тромбоциты.

ЛИТЕРАТУРА

- Васильева 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 Е.Н., Фризен Б.Н., Семин В.А. и др. (1985) Оценка состояния микроциркуляции, реологических свойств крови у больных 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.
- Петров М.Н., Вашкинел В.К., Алмазов В.А. (1975) О значении способа фиксации кровяных пластинок для оценки тромбоцитарной формулы. Лаб. дело, 1: 22–26.
- Талыбов Ф.Ю., Кубанцева Н.В., Дубровина Н.А. (1994) Лабораторная диагностика синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания у больных ревматоидным артритом. Клиническая медицина, 4: 25–28.
- Bank N.R., Aynedjian H.S. (1993) Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. Kidney Int., 43(9): 1306–1312.
- Green L.C., David A.W., Clodowski J. (1992) Analysis of nitrate, nitrite and (ISN) nitrate in biological fluids. Anal. Biochem., 1: 131–138.
- Sixma J., Linssien W., Geuze H. (1972) Glutaraldehyde fixation of human blood platelets. Tromb. Diath. Haemorr., 27: 272–277.
- Yan L., Vandivier R.W., Suffredini A.F., Danner R.I. (1994) Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide synthase activity. J. Immunol., 153(7): 1825–1834.
- Zechmeister A.A. (1979) A new selective ultrahistochemical method for the demonstration of calcium using N,N'-naphtholhydroxylamine. Histochem. J., 61(2): 229–239.

Таблица 2

Состояние функциональной активности NO-системы у больных РА в зависимости от степени активности

Группа больных	Нитрит-анион (NO ₂) пмоль/мг белка		Нитрат-анион (NO ₃) нмоль/мг белка		NO-синтетаза (NOS) пмоль за 1 мин на 1 мг белка	
	Эритроциты	Плазма крови	Эритроциты	Плазма крови	Эритроциты	Плазма крови
Доноры (n=10)	25,1±2,3	162,7±12,9	1,8±0,1	4,2±0,5	22,5±0,2	47,0±7,0
Больные РА (n=29)	20,4±1,7	107,0±18,0*	0,7±0,2*	8,5±1,4*	16,4±3,0	97,7±8,0*
Больные РА I степени активности процесса (n=11)	16,8±2,1	103,0±16,0	0,55±0,1*	6,7±1,6*	21,5±4,2	116,3±5,1*
Больные РА II степени активности процесса (n=18)	18,8±1,3	108,6±13,0	0,7±0,3**	12,5±0,9**	18,4±2,2	97,4±7,3*

* Различия достоверны по сравнению с группой доноров; ** — по сравнению с группой больных РА I степени активности процесса.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ТРОМБОЦИТІВ ТА ДИСФУНКЦІЯ NO-СИСТЕМИ У ХВОРИХ НА РЕВМАТОЇДНИЙ АРТРИТ

В.М. Коваленко, О.С. Гавриш, Н.М. Гулая,
О.В. Сергієнко, Г.Ф. Клубова, О.Л. Кіндзерська,
А.В. Коцюруба, О.М. Буханевич, Г.В. Косякова

Резюме. Досліджено ультраструктурні і цитохімічні особливості тромбоцитів та стан NO-системи у 29 хворих на ревматоїдний артрит залежно від активності імунізопального процесу. Електронно-цитохімічними методами виявляли аніонні групи глікокаліксу, іони кальцію, визначали активність аденілатциклази, фосфодіестерази циклічних нуклеотидів. Відзначено підвищення реактивності та зміни структури кров'яних пластинок у хворих. Активізація тромбоцитів поєднується з посиленням перебігу млявого екзоцитозу, частково альтерацією 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 виявляли найчастіше в активованих тромбоцитах. Відзначено тенденцію до більш значної активації кров'яних пластинок у хворих з імунізопальним процесом II ступеня активності. За даними біохімічних досліджень визначені ознаки активації NO-системи, що додатково виявляє дестабілізуючий вплив на тромбоцити.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, тромбоцити, NO-система, люмінесцентна мікроскопія, електронна мікроскопія.

THE ULTRASTRUCTURE OF BLOOD PLATELETS AND DYSFUNCTION OF NO-SYSTEM IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

V.N. Kovalenko, A.S. Gavrish, N.M. Gulaya,
O.V. Sergienko, A.F. Klubova, O.L. Kyndzerskaya,
A.V. Kotsuruba, A.M. Bukhanevich, G.V. Kosyakova

Summary. We studied ultrastructural and cytochemical particularities of blood platelets and function of NO-system in 29 patients with active rheumatoid arthritis. Using cytochemical method we examined anions of glyco-calix, calcium ions, activity of adenylatecyclase and phosphodiesterase of cyclic nucleotides. Significant increase of platelets reactivity and changes of platelets structure in patients with rheumatoid arthritis were demonstrated. The blood platelets activation was combined with increase of flaccid exocytosis, alteration of some part of blood platelets and partial necrosis. The typical ultrastructural changes of blood platelets in patients with rheumatoid arthritis were glyco-calix destruction, decrease of anion groups concentration and adenylatecyclase activity as well as calcium ion deflection in sites of glyco-calix destruction. The high phosphodiesterase activity of cyclic nucleotides was found mainly in activated blood platelets. Tendency of more blood platelets activation was revealed in patients with the II degree of activity of autoimmune process.

Key words: rheumatoid arthritis, thrombocytes, NO-system, luminescence electronic microscopy.

Адрес для переписки:

Коваленко Владимир Николаевич
03151, Киев, ул. Народного ополчения, 5
Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско
АМН Украины

РЕФЕРАТИВНА ІНФОРМАЦІЯ

Синдром раздраженной толстой кишки у психически больных

Колесников Д.Б. (2000) Синдром раздраженной толстой кишки у психически больных. Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 100(11): 24–30.

Обследованы 140 пациентов с синдромом раздраженной толстой кишки (СРТК), у которых отмечены психические расстройства. В соответствии с результатами клинического анализа особенностей манифестации, симптоматики и структуры коморбидности СРТК с психической патологией выделено два типа СРТК — с явлениями вегетативного и с явлениями конверсионного невроза (89,3 и 10,7% соответственно). СРТК с явлениями вегетативного невроза характеризуется: 1) спонтанной или соматогенной манифестацией; 2) мономорфностью и стойкостью абдоминалгий и нарушений стула; 3) ограничением функциональных расстройств органами пищеварительного тракта; 4) синдромальной и временной (параллелизм формирования и динамики) коморбидностью с эндогенными забо-

леваниями — 66% (циклотимия, вялотекущая шизофрения), ипохондрическим развитием — 16% и тревожно-фобическими расстройствами — 18%; 5) сопряженностью с субклинической соматической патологией пищеварительного тракта. СРТК с явлениями конверсионного невроза характеризуется: 1) психогенно обусловленной манифестацией; 2) полиморфностью и изменчивостью абдоминалгий и нарушений стула; 3) полиморфизмом функциональных расстройств различных органов систем; 4) синдромальной и временной (параллелизм формирования и динамики) коморбидностью с субсиндромальными психическими расстройствами: преходящими истероипохондрическими фобиями (кардиофобия, танатофобия) — 60%, кратковременными (не более 2–3 мес) ситуационно обусловленными истероаффективными реакциями — 40%; 5) отсутствием или минимальной выраженностью сопутствующей субклинической соматической патологии пищеварительного тракта.