

УДК 612.2

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРЕБЫВАНИЯ В УСЛОВИЯХ АНТАРКТИКИ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ И ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У ЛЮДЕЙ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ

Е.В. Розова, Е.В. Моисеенко

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, moiseenko@biph.kiev.ua

Работа посвящена изучению изменений ультраструктуры тромбоцитов у зимовщиков при гипоксической стимуляции до и после длительного пребывания в Антарктике. Показано, что ультраструктурные показатели тромбоцитов у антарктических зимовщиков значительно модифицируются. Изменения свидетельствуют о напряженности функционирования как тромбоцитов, так и, вероятно, клеток-предшественников. Реакции тромбоцитов на гипоксическую стимуляцию крови зимовщиков имели характерные особенности. Их можно рассматривать как компенсаторно-приспособительные. Механизмы таких преобразований характеризуются возрастанием функциональной активности органелл за счет отека умеренной степени, что может свидетельствовать об увеличении энергопродукции и активации процессов гликолиза.

Вплив тривалого перебування в умовах Антарктики на ультраструктуру і функції тромбоцитів у людей при гіпоксичному навантаженні.

К.В. Розова, Є.В. Моїсеєнко.

Реферат. Роботу присвячено вивченню змін ультраструктури тромбоцитів у зимівників при гіпоксичній стимуляції до та після тривалого перебування в Антарктиці. Доведено, що ультраструктурні показники тромбоцитів у антарктичних зимівників значно модифікуються. Зміни свідчать про напруженість функціонування як тромбоцитів, так і, вірогідно, клітин-попередників. Реакції тромбоцитів на гіпоксичну стимуляцію крові зимівників мали характерні особливості. Їх можна розглядати як компенсаторно-приспосовні. Механізми таких перетворень характеризуються зростанням функціональної активності органелл за рахунок набряку помірного ступеня, що може свідчити про збільшення енергопродукції та активацію процесів гліколізу.

Long stay effects in the Antarctic on ultrastructure and platelet function in people with load hypoxic.

E. V. Rozova, Y. V. Moiseyenko.

Abstract. The work is devoted to the study of changes in the platelets ultrastructure (in winterers) in hypoxic stimulation before and after a long stay in Antarctica. It is shown that the ultrastructural parameters of platelets in Antarctic winterers significantly modified. Changes in tension indicates a platelet function and probably progenitor cells. Reaction of winterer' platelets to hypoxic stimulation have the characteristic features. They can be considered as a compensatory-adaptive. The mechanisms of such transformations are characterized by the increase of the functional activity of organelles due to a moderate degree of edema, which may indicate an increase in energy production and activation of glycolysis.

Keywords: platelets, mitochondria, hypoxia, winterers, Antarctica

Введение

Длительное осуществление человеком трудовой деятельности в Антарктике непосредственно связано с воздействием на организм экстремальных экологических условий. Резкие изменения гелиогеофизических влияний, таких как напряженность природного электромагнитного поля, стоковые ветры, уменьшенный озоновый слой, отсутствие достаточно дли-

тельных промежутков времени, в течение которых атмосферные параметры были бы строго постоянны, негативно воздействуют на состояние здоровья зимовщиков. Кроме того что климатом в Антарктике управляют холод и ветер, свой вклад в формирование климатического пейзажа вносит также высота: если учесть, что средняя высота тамошней ледниковой поверхности (около 2040 м) в 2,8 раза превышает среднюю высоту всех других материков (730 м), то при анализе влияния на организм антарктических условий следует учитывать и гипоксический фактор [3, 7]. Поэтому в процессе адаптации человека к пребыванию в условиях Антарктики существенное значение имеет функциональное состояние митохондриального (МХ) аппарата в клетках различных тканей организма, поскольку именно благодаря метаболической активности МХ обеспечиваются сохранение и увеличение мощности энергетического метаболизма, что играет важную роль при неблагоприятных, в том числе включающих гипоксический компонент, воздействиях окружающей среды [10, 18].

Удобной моделью при проведении исследований с участием групп людей в различных условиях окружающей среды являются клетки крови, в частности, тромбоциты (Т). Последние представляют собой высокоспециализированные безъядерные клетки (по мнению некоторых исследователей – клеточные фрагменты [4]), участвующие во многих процессах, которые протекают в организме: в регенерации тканей, развитии воспалительных и иммунных реакций, обеспечении первичного гомеостаза [6, 21]. Многие исследователи считают тромбоциты примером единства структуры и функции [4, 15]. Помимо значительного количества различных гранул, включающих в себя гликопротеины, белки, факторы роста, АДФ, АТФ, ионы кальция, серотонин, гистамин и т.п., Т содержат определенное количество митохондрий (МХ), доставшихся им в наследство от предшественников – мегакариоцитов, что позволяет изучать структуру и функции данных органелл в изменяющихся условиях существования организма [2, 14, 23].

Целью представленной работы явилось изучение изменений ультраструктуры тромбоцитов у зимовщиков при гипоксической нагрузке до и после длительного пребывания в Антарктике.

Материалы и методы исследования

Изучение ультраструктуры Т проводили в тромбоцитарной массе, полученной центрифугированием из крови обследуемых лиц до и после гипоксической нагрузки. Обогащенную тромбоцитами плазму получали центрифугированием цельной крови при комнатной температуре в течение 15 мин. при 120 g на центрифуге лабораторной Т-30 (Украина). Плазму аккуратно отделяли от осевых клеток и центрифугировали при 2000 g в течение 20 мин. с помощью мини-центрифуги Vortecs Combispin FVL-2400N (Латвия) [8, 15, 17].

Обследования проводили в группе, которая готовилась к 17-й (длительностью 12 месяцев) Украинской антарктической экспедиции на станцию Академик Вернадский (n=6) (подгруппа 1 (контрольная) – до гипоксической нагрузки; подгруппа 2 – после гипоксической нагрузки), и в группе лиц, возвратившихся после зимовки в Антарктике (n=11) (подгруппа 3 – до гипоксической нагрузки; подгруппа 4 – после гипоксической нагрузки).

Гипоксическая стимуляция осуществлялась двумя путями: дыханием воздухом с пониженным содержанием кислорода (до 12%) и достижением гипоксического состояния при выполнении тяжелой физической работы на велоэргометре (75% от должного максимального потребления кислорода).

Приготовление образцов для электронно-микроскопического исследования осуществлялось в соответствии с общепринятой методикой для форменных элементов крови с двойной фиксацией OsO₄ и глутаральдегидом, обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации и заливкой в Epon-Araldit (реактивы фирмы Fluka, Швейцария) [5].

Ультратонкие срезы толщиной 40–60 нм контрастировали при помощи 1% раствора уранилацетата и раствора цитрата свинца (реактивы фирмы Sigma, США) и просматривали в электронном микроскопе ПЕМ-124С (Украина).

Морфометрические подсчеты выполняли с помощью программы компьютерной Image Tool Version 3 (США) на 130–150 полях для каждой группы обследуемых в соответствии с подходами Вейбеля [13]. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы «Microsoft Excel 2003» с использованием критерия ϕ Фишера и t критерия Стьюдента. Различия между средними величинами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ полученных результатов показал, что у лиц 1 подгруппы Т в большинстве случаев (более половины) можно было отнести к молодым формам в соответствии с их размерами [1, 2] (таблица).

Таблица

Площадь тромбоцитов у зимовщиков обследуемых подгрупп (M±m)

Обследуемые зимовщики	Средняя площадь тромбоцитов, $\mu\text{м}^2$	Количество молодых тромбоцитов относительно их общего числа, %
1 подгруппа	49,6±2,3	58,6
2 подгруппа	35,2±3,3*	47,4*
3 подгруппа	35,8±3,1*	36,0*
4 подгруппа	32,4±2,0*	42,1*

* Различия достоверны относительно контрольных величин 1 подгруппы ($p < 0,05$).

Выявлено также, что Т контрольной подгруппы содержали оптически плотные тельца (плотные гранулы) в количестве 5–12 (рис. 1). Считается, что такие гранулы содержат серотонин, АДФ и АТФ, а также аккумулируют Ca^{2+} . Причем количество плотных гранул зависит именно от количества серотонина, что представляется особенно важным, поскольку последний оказывает непосредственное влияние на сокращение мышечных клеток в стенках большинства сосудов [1, 14, 17]. Следовательно, количество плотных гранул может в определенной степени являться маркером сократительной способности сосудистой стенки.

Наличие α -гранул (3–5 на клетку) (см. рис. 1) является свидетельством того, что в исследуемых Т сохраняются (и продолжают секретироваться, поскольку данные гранулы считаются секреторными) гидролитические ферменты: кислая фосфатаза, β -глюкуронидаза, катепсин [2, 4, 14].

Т имели хорошо развитый внутренний скелет, о чем свидетельствовало наличие значительного количества (5–10 на клетку) оптически прозрачных трубочек (так называемых канальцев) (см. рис. 1). Расположение значительного количества канальцев на периферии Т следует рассматривать как следствие высокой интенсивности обменных процессов, поскольку именно путем инвагинации покровной мембраны осуществляется поглощение различных веществ Т или их высвобождение [1, 13, 22].

Что касается МХ, то подсчитывать их количество в Т контрольной группы для выдвижения предположений относительно морфогенеза МХ либо интенсивности энергообмена представляется некорректным вследствие их малого количества [1, 16] – в исследуемых клетках выявлялось 2 (реже 4) органеллы. Однако существует возможность изучать ультраструктуру МХ, которая в определенной степени отражает морфологию МХ в клетках-предшественниках. Органеллы отличались электронно-плотным матриксом, были хорошо структурированы, что свидетельствует о возможности МХ эффективно

осуществлять синтез макроэргов (см. рис. 1). Средний диаметр МХ составлял $0,60 \pm 0,04$ мкм, т.е. органеллы были достаточно крупными [9, 10].

После гипоксической нагрузки (2 подгруппа) количество молодых Т с площадью > 42 мкм уменьшилось на 11,2% (см. таблицу); преобладали Т, площадь которых составляла $35,2 \pm 3,3$ мкм². Принято считать, что увеличение средних геометрических размеров Т свидетельствует о появлении в циркуляции более высокого процента активных тромбоцитов, а снижение оптических параметров – о недостаточности или опустошенности плотных гранул [1, 19, 23]. Действительно, у обследуемых 2 подгруппы в Т значительно снижалось количество плотных гранул (до 3–5 на клетку); некоторые Т вообще не содержали таких телец (рис. 2).

Если считать, что этот показатель непосредственно связан с количеством серотонина, то возможно предположить, что выявленный факт может отражать уменьшение его содержания, а следовательно и сократимости сосудистой стенки. Такой вывод, вероятно, может быть распространен по крайней мере и на некоторые другие клетки, поскольку Т представляют собой обломки мегакариоцитов и соответственно дают представление об изменениях, которые имеют место в клетках костного мозга. Кроме того, считают, что уменьшение оптической плотности этих гранул может указывать на угнетение тромбоцитопоэза и снижение функциональной активности Т [19, 20, 22].

Общее количество α -гранул сохранялось на уровне контрольных величин, т.е. Т сохраняли свою секреторную способность. Сохранным был и внутренний скелет тромбоцитов.

Существенные изменения происходили в ультраструктуре МХ после гипоксической нагрузки (см. рис. 2). Во-первых, выявлялись частично вакуолизированные органеллы, также МХ с менее грубым, чем в контроле, матриксом, что часто рассматривают как признак активации гликолиза [2, 20, 23]. Такие изменения свойственны реакции митохондриального аппарата клеток разных тканей организма на гипоксическую гипоксию [9, 10, 12]. Во-вторых, диаметр МХ достоверно уменьшался до $0,47 \pm 0,05$ мкм ($p < 0,05$). Такой процесс рассматривают неоднозначно: а) как низкую активность МХ или начальную стадию митохондриального пути апоптоза; б) как адаптивные изменения, приводящие к оптимизации энергообмена путем увеличения суммы поверхностей митохондрий в единице объема ткани [11].

Тромбоциты у лиц, вернувшихся после зимовки в Антарктике, в основном (на 64,0%) были представлены пластинками средней площади – $35,8 \pm 3,1$ мкм² (см. таблицу). При этом выявлялись Т, которые были плотно покрыты гранулами гликогена (рис. 3). У значительного количества клеток практически всю площадь поверхности занимали каналцы эндоплазматического ретикулула, и цитоплазма сохранялась лишь фрагментарно (см. рис. 3). Такие особенности ультраструктуры являются свидетельством перенапряжения функций клеток – как предшественников Т, так и самих тромбоцитов [2, 4, 23].

Т у лиц 3 подгруппы практически не содержали плотных телец, в то же время возрастало количество α -гранул (см. рис. 3). Данная динамика изменений ультраструктуры указывает, во-первых, на уменьшение содержания серотонина, т.е. опосредованно на снижение сократительной активности сосудистой стенки; во-вторых, на существенное истощение депо АДФ и АТФ. Кроме того, поскольку α -гранулы содержат гидролитические ферменты и выполняют в Т роль лизосом, можно считать, что Т действительно функционируют в достаточно напряженном режиме и готовы к активации обменных процессов [6, 14, 20].

Уменьшение количества макроэргов при напряжении функционирования клетки требует оптимизации (активации) энергопродукции. Подтверждением такой возможности в Т лиц, длительное время находившихся в неблагоприятных условиях, является увеличение количества МХ – оно достигало 5–7 (иногда 10) на клетку, что не свойственно кровяным пластинкам, содержащим, как указывалось выше, единичные органеллы. При определении среднего диаметра МХ выявлено, что в Т преимущественно выявлялись достаточно мелкие органеллы с диаметром $0,40 \pm 0,3$ мкм, что меньше контрольных величин на 50%. Такой тип изменений морфометрических параметров МХ свойственен для организмов, длительное

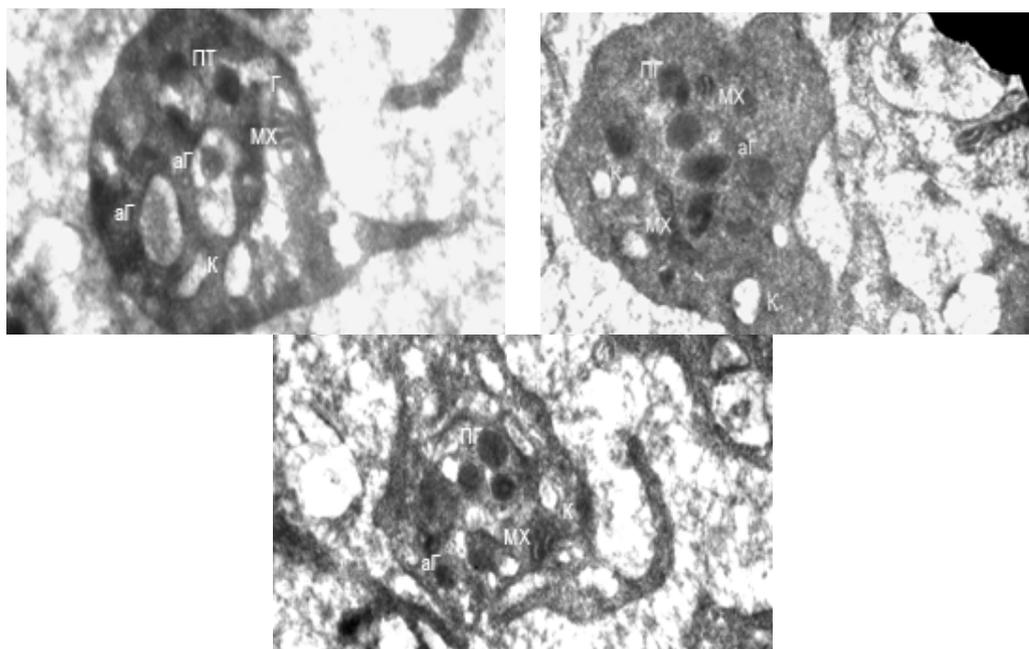


Рис. 1. Ультраструктура тромбоцитов в контрольной группе (1 подгруппа). МХ – митохондрии, ПГ – плотные гранулы (плотные тельца), К – система канальцев, аГ – α -гранулы. $\times 12000$.

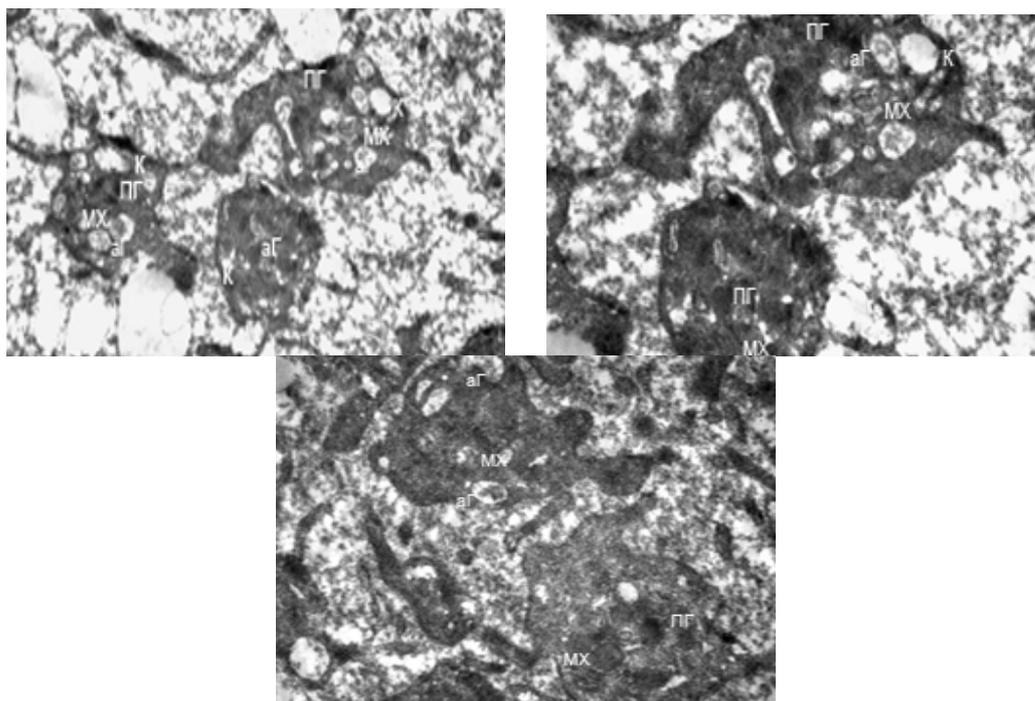


Рис. 2. Ультраструктура тромбоцитов после гипоксической нагрузки (2 подгруппа). МХ – митохондрии, ПГ – плотные гранулы (плотные тельца), К – система канальцев, аГ – α -гранулы. $\times 9600$.

время (в течение нескольких поколений) находящихся в гипоксических условиях. Мы поддерживаем точку зрения тех исследователей, которые рассматривают данный процесс как элемент адаптации [10].

После гипоксической нагрузки у лиц, вернувшихся из Антарктики (подгруппа 4), ультраструктура Т оставалась практически неизменной относительно проанализированной у 3 подгруппы (рис. 4).

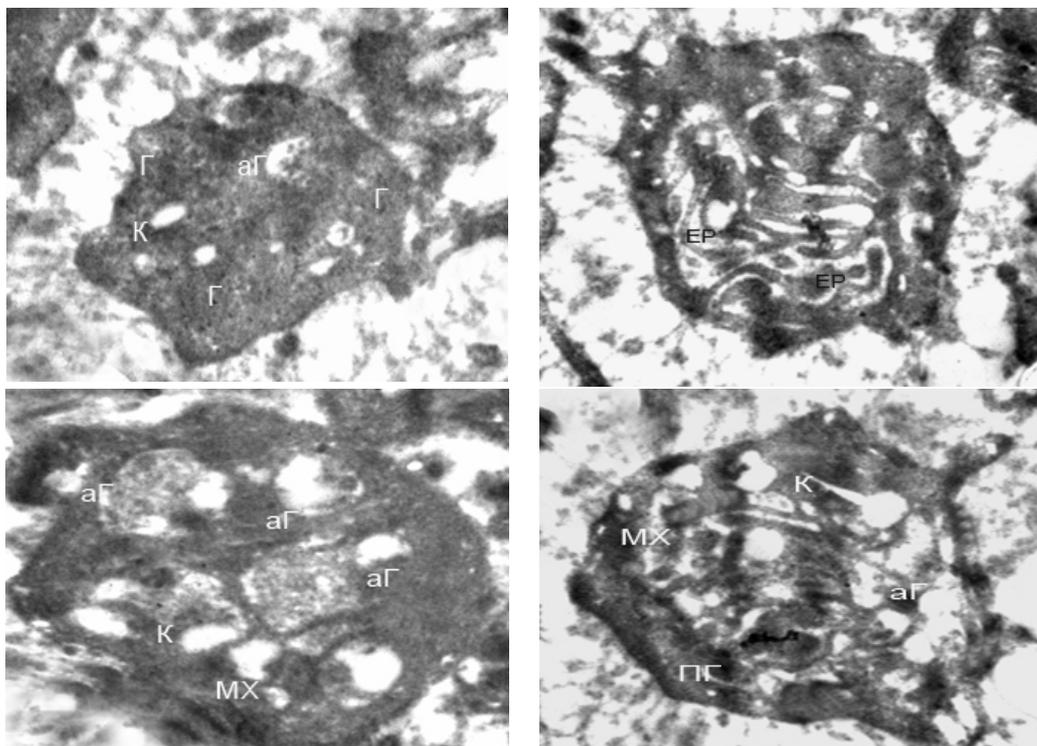


Рис. 3. Ультраструктура тромбоцитов в группе после пребывания в Антарктике (подгруппа 3). МХ – митохондрии, ПГ – плотные гранулы (плотные тельца), К – система канальцев, аГ – α -гранулы, Г – гранулы гликогена, ЕР – эндоплазматичный ретикулум. х 18000.

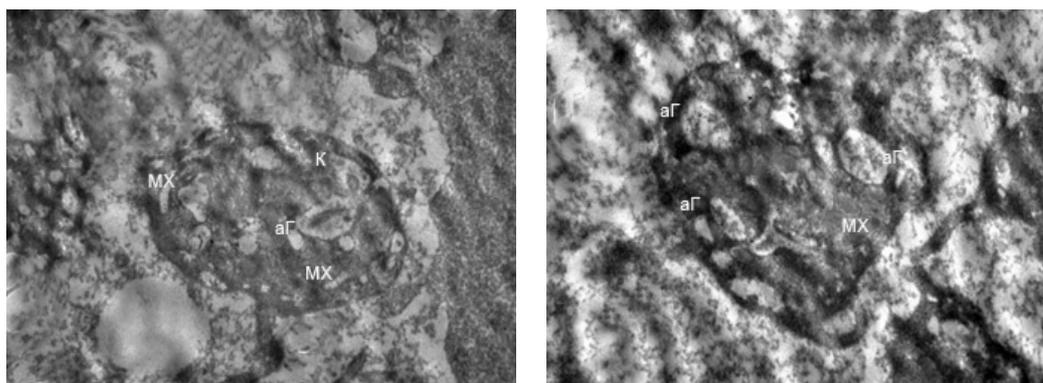


Рис. 4. Ультраструктура тромбоцитов в крови зимовщиков после пребывания в Антарктике и гипоксической нагрузки (подгруппа 4). МХ – митохондрии, аГ – α -гранулы. х 12000.

Однако этого нельзя сказать про митохондриальный аппарат Т. Средний диаметр МХ достоверно возрастал за счет отека умеренной степени, что принято рассматривать как показатель увеличения функциональной активности [9, 11, 12]. Диаметр МХ достигал в среднем $0,69 \pm 0,05$ мкм, что имело тенденцию к превышению контрольных величин (рис. 5).

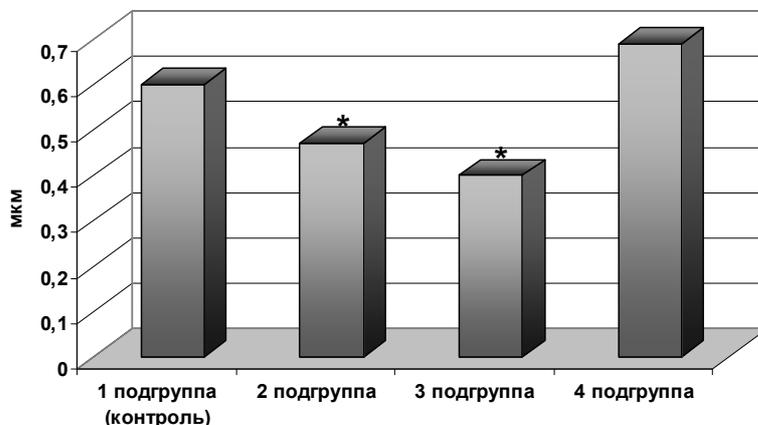


Рис. 5. Изменение диаметра митохондрий у лиц обследуемых подгрупп.

* – различия достоверны относительно контрольных величин 1 подгруппы ($p < 0,05$).

При этом ряд органелл имел выраженные признаки деструкции (расплавление и потеря регулярности крист) и частичной вакуолизации (см. рис. 4).

Заключение

Таким образом, пребывание в условиях Антарктики значительно модифицирует ультраструктуру Т. Возникающие изменения указывают на напряженность функционирования как Т, так и, вероятно, клеток-предшественников. Кроме того, практически полное исчезновение плотных гранул может указывать на истощение депо серотонина в Т, что имеет существенное значение для функции сосудистой стенки. Такая динамика подобна реакции Т на гипоксическую нагрузку у лиц, которые не зимовали в Антарктике.

Реакция на гипоксию у лиц, которые провели и не провели длительное время в Антарктике, существенно различалась. Особенно это касается митохондриального аппарата Т, который реагировал на гипоксическую нагрузку противоположно: во 2 подгруппе МХ значительно уменьшались в размере, а в 4 – достоверно увеличивались. Оба эти процесса можно рассматривать как компенсаторно-приспособительные, однако механизмы, задействованные в формировании адаптивных реакций, различаются. В первом случае это оптимизации энергообмена путем увеличения суммы поверхностей митохондрий в единице объема ткани, во втором – возрастание функциональной активности органелл за счет отека умеренной степени, который характеризует не только увеличение энергопродукции, но и активацию гликолиза.

Литература

1. **Амосова Е.Н.** Новые стандарты тромболитической, антикоагулянтной и антитромбоцитарной терапии инфаркта миокарда с подъемом сегмента ST по обе стороны Атлантики. Е.Н. Амосова // Серце і судини. – 2009. – № 2. – С. 4-11.
2. **Вашкинель В.К.** Ультраструктура и функция тромбоцитов человека / В.К. Вашкинель, М.Н. Петров. – Л.: Наука, 1982. – 88 с.

3. **Влияние** предварительной тренировки низкочастотной стимуляцией на адаптивные перестройки церебрального электрогенеза и показатели самооценки человека в условиях Антарктики / Л.П. Забродина, В.И. Сухоруков, Е.В. Моисеенко [и др.] // Теор. і експерим. мед. - 2009. - № 3. - С. 36-42.
4. **Данилов И.П.** Тромбоциты: новый взгляд на их роль в организме / И.П. Данилов // Мед. новости. – 2008. – № 9. – С. 17-19.
5. **Карупу В.Я.** Электронная микроскопия / В.Я. Карупу. – К.: Вища школа, 1984. – 208 с.
6. **Колосова Е.Н.** Оценка морфофункционального состояния тромбоцитов у больных идиопатической тромбоцитопенической пурпурой методом витальной компьютерной морфометрии / Е.Н. Колосова, И.А. Василенко, Л.Г. Ковалева // Бюлл. СО РАМН. – 2011. - Т. 31, № 2. – С. 58-63.
7. **Мониторинг** параметров атмосферы в Украине и на антарктической станции «Академик Вернадский»: актуальность исследований, аппаратное обеспечение, концепция развития / Э.И. Терез, В.Н. Ващенко, С.О. Долгий [и др.]. - Укр. антарктичний журн. – 2007/2008. - № 6-7. – С. 143-149.
8. **Особенности** выделения и состояние тромбоцитов у больных шизофренией / Г.П. Злобина, О.С. Брусов, М.А. Морозова, А.Г. Бенишвили // Журн. неврологии и психиатрии. – 2009. - № 10.- С. 47-50.
9. **Резников К.М.** Общие механизмы формирования ответных реакций организма на воздействие факторов окружающей среды / К.М. Резников // Прикладные информационные аспекты медицины. Сб. научн. работ. – Воронеж, 1998. – Т. 1. – С. 4-9.
10. **Розова К.В.** Структурные и функциональные изменения биологических барьеров и митохондриального аппарата легких и сердца и их роль в обеспечении организма кислородом при гипоксии и стрессе: дис. ... докт. биол. наук : 03.00.13 / Розова Е.В. – К., 2013. – 401 с.
11. **Скулачев В.П.** Кислород и явления запрограммированной смерти / В.П. Скулачев // Российский биомедицинский журнал. – 2001. – № 5. – С. 116-126.
12. **Судакова Ю.В.** Деструктивные изменения митохондрий кардиомиоцитов человека при алкогольном поражении сердца / Ю.В. Судакова, Л.Е. Бакеева, В.Г. Цыпленкова // Архив патологии. – 1999. - № 9. – С.19-23.
13. **Ташке К.** Введение в количественную цито-гистологическую морфологию / К. Ташке. – Бухарест: Изд-во Академии СРР, 1980. – 192 с.
14. **Ультроструктура** тромбоцитов и дисфункция NO-системы у больных с ревматоидным артритом / В.Н. Коваленко, А.С. Гавриш, Н.М. Гулая [и др.] // Укр. мед. часопис. – 2001. – № 3. – С. 129-132.
15. **Филиппова О.И.** Методы исследования функциональной активности тромбоцитов (обзор литературы) / О.И. Филиппова, А.В. Колосков, А.А. Столица // Трансфузиология. – 2012. – Т. 13, № 2. – С. 493-514.
16. **Хем А.** Гистология / А. Хем, Д. Норман. – М.: Мир, 1983. – Т. 2. – 254 с.
17. **Электронно-гистохимическое** и морфофункциональное исследование тромбоцитов человека после приема ацетилсалициловой кислоты / В.К. Вашкинель, М.Н. Петров, В.А. Алмазов, Л.В. Сафронников // Пробл. гематол. и переливания крови. – 1981. – № 9. – С. 40-44.
18. **Changes** in breathing and mitochondrial respiration in rats living in altitude during intermittent hypoxia training / V.I. Portnichenko, V.I. Nosar, A.G. Portnichenko [at all.] : VIII World Congress International Society for Adaptive Medicine (ISAM) (21-24 червня 2006, Росцбья, Москва). – 2006. – С. 162.
19. **Clouser S., Cramer-Borde E.** Role of platelet electron microscopy in the diagnosis of platelet disorders / S. Clouser, E. Cramer-Borde // Semin. Thromb. Hemost. – 2009. – № 35 (2). – P. 213-223.
20. **Collet J.P.** Platelet function testing and implication for clinical practice / J.P. Collet, G. Montalescot // J. Cardiovasc Pharmacol Ther. – 2009. – Vol. 14 (3). – P. 157-169.
21. **Platelet** depletion in mice increases mortality after thermal injury / S. Fujimi, M.P. MacConmara, A.A. Maung [et al.] // Blood. - 2006. - V. 107, N II. - P. 4399-4406.
22. **Platelet** ultrastructure and secretion in acute ischemic stroke / R. Joseph, J.M. Riddle, K.M. Welch, G. D'Andrea // Stroke. – 1989. – № 20. – P. 1316-1319.
23. **Watso S.P.** Platelets / S.P. Watso, K.S. Authi. – Oxford, 1996. – 370 p.