

Ультраструктурні зміни тромбоцитів у хворих на цукровий діабет 1 та 2 типів залежно від стану ниркової функції на різних стадіях хронічної ниркової недостатності

Н. О. Перцева^{A,E,F}, І. В. Твердохліб^{A-E}, Д. І. Чуб^{*A,E}

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – вивчити ультраструктурні зміни тромбоцитів у хворих на цукровий діабет (ЦД) 1 та 2 типів залежно від рівня швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) та оцінити можливість їх використання як раннього маркера прогресування діабетичної хвороби нирок.

Матеріали та методи. У дослідження залучили 37 осіб: 15 хворих на ЦД 1 типу, 15 пацієнтів із ЦД 2 типу, 7 здорових добровольців. Хворих поділили на 3 групи залежно від рівня ШКФ: група 1 – ШКФ ≥ 90 мл/хв/1,73 м² і більше; група 2 – ШКФ 89–60 мл/хв/1,73 м²; група 3 – ШКФ 59–45 мл/хв/1,73 м². Для визначення ультраструктурних змін тромбоцитів використовували метод електронної мікроскопії за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЭМ-100-01 «SELMi» (Україна).

Результати. Вивчили ультраструктурні зміни тромбоцитів у хворих на ЦД 1 та 2 типів залежно від рівня ШКФ. Встановили наявність початкових змін тромбоцитарного гемостазу у хворих зі ШКФ ≥ 90 мл/хв/1,73 м². Показали, що з прогресуванням ушкоджень фільтраційної функції нирок підвищувався ступінь ушкодження мембранних структур тромбоцитів, збільшувалася кількість ознак гіперактивності тромбоцитів та частка незворотно трансформованих клітин.

Висновки. Морфологічним субстратом ушкодження тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД 1 та 2 типів є посилення дестабілізації тромбоцитарних мембран, масивне агрегатоутворення з переважанням ущільнених агрегатів різних розмірів, залучення до їх складу незворотно деформованих еритроцитів та активованих лейкоцитів, дисбаланс щільності упакування альфа-, дельта- і лямбда-гранул. Цей ультраструктурний комплекс можна вважати раннім маркером прогресування діабетичної хвороби нирок у хворих на ЦД 1 та 2 типів.

Ключові слова: тромбоцитарний гемостаз, цукровий діабет 1 і 2 типу, швидкість клубочкової фільтрації.

Патологія. – 2019. – Т. 16, № 2(46). – С. 207–213

DOI: 10.14739/2310-1237.2019.2.177126

***E-mail:** borisovadi@ukr.net

Ультраструктурные изменения тромбоцитов у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов в зависимости от состояния почечной функции на разных стадиях хронической почечной недостаточности

Н. О. Перцева, И. В. Твердохлеб, Д. И. Чуб

Цель работы – изучить ультраструктурные изменения тромбоцитов у больных сахарным диабетом 1 (СД 1) и 2 (СД 2) типов в зависимости от уровня скорости клубочковой фильтрации (СКФ) и оценить возможность их использования в качестве раннего маркера прогрессирования диабетической болезни почек.

Материалы и методы. В исследование включили 37 человек: 15 больных СД 1 типа, 15 пациентов с СД 2 типа, 7 здоровых добровольцев. Больные разделены на три группы в зависимости от уровня СКФ: группа 1 – СКФ ≥ 90 мл/мин/1,73 м² и выше; группа 2 – СКФ 89–60 мл/мин/1,73 м²; группа 3 – СКФ 59–45 мл/мин/1,73 м². Для определения ультраструктурных изменений тромбоцитов использовали метод электронной микроскопии с помощью трансмиссионного электронного микроскопа ПЭМ-100-01 «SELMi» (Украина).

Результаты. Изучены ультраструктурные изменения тромбоцитов у больных СД 1 и 2 типов в зависимости от уровня СКФ. Установлено наличие начальных изменений тромбоцитарного гемостазу у больных с СКФ ≥ 90 мл/мин/1,73 м². Доказано, что с прогрессированием поврежденной фильтрационной функции почек повышалась степень повреждения мембранных структур тромбоцитов, увеличивалось количество признаков гиперактивации тромбоцитов и доля необратимо трансформированных клеток.

Выводы. Морфологическим субстратом повреждения тромбоцитарного гемостазу у больных СД 1 и 2 типов является усиление дестабилизации тромбоцитарных мембран, массивное агрегатообразование с преобладанием уплотненных агрегатов различных размеров, привлечение в их состав необратимо деформированных эритроцитов и активированных лейкоцитов, дисбаланс плотности упаковки альфа-, дельта- и лямбда-гранул. Этот ультраструктурный комплекс можно рассматривать как ранний маркер прогрессирования диабетической болезни почек у больных СД 1 и 2 типов.

Ключевые слова: тромбоцитарный гемостаз, сахарный диабет 1 и 2 типа, скорость клубочковой фильтрации.

Патология. – 2019. – Т. 16, № 2(46). – С. 207–213

Ultrastructural changes of platelets in patients with diabetes mellitus type 1 and 2 depending on the state of renal function at different stages of chronic renal failure

N. O. Pertseva, I. V. Tverdokhlib, D. I. Chub

The aim of our study was to study the ultrastructural changes of platelets in patients with diabetes mellitus type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) depending on estimated glomerular filtration rate (eGFR) and to assess the possibility of their use as an early marker of diabetic kidney disease progression.

Key words: platelet hemostasis, diabetes mellitus 1 and 2 type, estimated glomerular filtration rate.

Pathologia
2019; 16 (2), 207–213

Materials and methods. The study included 37 people: 15 patients with T1DM, 15 with T2DM, 7 healthy volunteers. Patients were divided into three groups depending on eGFR: group 1 – eGFR ≥ 90 ml/min/1.73 m²; group 2 – eGFR 89–60 ml/min/1.73 m²; group 3 – eGFR 59–45 ml/min/1.73 m². Transmission electron microscope PEM-100-01 “SELMI” (Ukraine) was used to determine the ultrastructural changes of platelets.

Results. We studied ultrastructural changes of platelets in patients with T1DM and T2DM depending on eGFR and determined the changes in platelet hemostasis in patients with eGFR ≥ 90 ml/min/1.73 m². We proved that the higher damage degree of kidneys filtration function leads to the worse platelets membrane structures damage, increased number of platelet hyperactivation signs, higher proportion of irreversibly transformed cells.

Conclusion. Morphological substrate of platelet hemostasis damage in patients with T1DM and T2DM is increased destabilization of the platelet membranes, massive agglutination with a predominance of various sizes condensed aggregates, the involvement of irreversibly deformed erythrocytes and activated leukocytes in their composition, imbalance of density packing of alpha-, delta-, and lambda- granules. This ultrastructural complex can be considered as an early marker of diabetic kidney disease progression in patients with T1DM and T2DM.

Останніми роками особливе значення в патогенезі мікроциркуляторних уражень при цукровому діабеті (ЦД) надають змінам у судинно-тромбоцитарній ланці системи гемостазу [1,2]. Функціональна активність тромбоцитів супроводжується кардинальною зміною їхньої внутрішньої структури, тому під час вивчення морфології тромбоцитів розрізняють клітини стадії «спокою» – неактивовані тромбоцити – і клітини, що знаходяться на різних стадіях активації. Під впливом індукторів агрегації відбувається видозміна форми тромбоцитів від дископодібної до сферичної з утворенням псевдоподій і склеювання їх – адгезія тромбоцитів [3]. Неактивовані тромбоцити – дрібні дископодібні клітини діаметром 2–5 мкм, в них є периферична частина – гіаломер, центральна частина – грануломер, що містить гранули. На ультраструктурному рівні у складі гіаломера виявляють елементи цитоскелета – мікротрубочки й актин-міозинові комплекси, що визначають форму тромбоцитів у стадії спокою та при активації. Тромбоцити містять велику кількість секреторних везикул – тромбоцитарні гранули діаметром від 200 нм до 600 нм [4,5]. Розрізняють кілька їх типів:

- великі альфа-гранули, які містять глікопротеїни (фібриноген, фібронектин, фактор Віллебранда), білки, що зв'язують гепарин (фактор 4 тромбоцитів, що також регулює проникність судин, хемотаксис нейтрофілів та еозинофілів), фактори росту (тромбоцитарний фактор росту, трансформуючий фактор росту- β , фактор росту ендотелію судин, фактор росту епітелію, фактор росту фібробластів, інсуліноподібний фактор росту), фактори згортання (тромбопластин, фактор V тощо) і тромбосподин, який бере участь у процесах згортання крові, запалення, регенерації;

- щільні дельта-гранули, що містять АДФ, АТФ, Ca²⁺, серотонін, гістамін;

- гамма-гранули (лізосоми та мікропероксисоми), в яких містяться протеолітичні ферменти [4,5].

Під час активації тромбоцитів відбувається викид вмісту гранул назовні, після чого процес активації стає незворотним. Вважається, що дегрануляція тромбоцитів є необхідною умовою для їхньої наступної агрегації [6]. Тому для визначення функціональної активності тромбоцитів вивчають співвідношення різних форм тромбоцитів, кількість органел, щільність упакування гранул, характер і кількість відростків, що утворюються.

У роботах вітчизняних науковців показано, що морфологічним субстратом ушкодження тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД 2 типу з артеріальною гіпертензією (АГ) є комплекс ультраструктурних змін клітин тромбоцитів, який є раннім предиктором розвитку судинних ускладнень ЦД і АГ. Доведено, що ступінь порушення тромбоцитарного гемостазу залежав від рівня МАУ та якості глікемічного контролю. У хворих із МАУ встановили ушкодження тромбоцитарного гемостазу внаслідок значущого зростання вмісту активованих, дегранульованих і агрегованих тромбоцитів [7]. У деяких роботах показано, що функція тромбоцитів при ЦД 1 типу характеризується підвищенням спонтанної агрегації, а також підвищенням агрегації тромбоцитів, індукованої тромбіном, колагеном, арахідоновою кислотою, адреналіном або АДФ [2]. Зміни властивостей тромбоцитів погіршують гемодинаміку і призводять до розвитку мікроангіопатій, зокрема до нефропатії та нефросклерозу. Отже, дослідження морфологічних ознак здатності тромбоцитів до активації, їхніх структурних і функціональних змін на тлі хронічної гіперглікемії – актуальне питання, що потребує вивчення.

Мета роботи

Вивчити ультраструктурні зміни тромбоцитів у хворих на цукровий діабет 1 і 2 типів залежно від рівня швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) та оцінити можливість їх використання як раннього маркера прогресування діабетичної хвороби нирок.

Матеріали і методи дослідження

У дослідження залучили 37 осіб: 15 хворих на ЦД 1 типу, 15 пацієнтів із ЦД 2 типу, 7 здорових добровольців. Критерії залучення в дослідження: наявність ЦД 1 типу, ЦД 2 типу, добровільної інформованої згоди.

Критерії виключення: відмова пацієнта, інші види діабету (гестаційний ЦД, вторинний ЦД, панкреатектомія), важкий перебіг ЦД і його гострі ускладнення (діабетичний кетоацидоз, коми, важка гіпоглікемія, ампутації нижніх кінцівок), ЦД 1 типу (ЦД1) із ШКФ менше ніж 45 мл/хв/1,73 м²; ЦД 2 типу (ЦД2) із ШКФ менше ніж 45 мл/хв/1,73 м²; важка супутня патологія (ХСН NYHA III та IV ФК, гострий коронарний синдром, транзиторна ішемічна атака за останні 6 місяців, гепатити В і С, вагітність).

Набір пацієнтів здійснили на базі ВСП «Клініка медичної академії» ДЗ «ДМА», відділення ендокринології у 2017 р. Хворих поділили на 3 групи залежно від рівня ШКФ: група 1 – ШКФ 90 мл/хв/1,73 м² і більше (n = 10); група 2 – ШКФ 89–60 мл/хв/1,73 м² (n = 10); група 3 – ШКФ 59–45 мл/хв/1,73 м² (n = 10). У кожній групі виділили дві підгрупи: підгрупа 1 – хворі на ЦД1, підгрупа 2 – хворі на ЦД2, які представлені рівними частинами в кожній групі – по 5 осіб. Група контролю суттєво не відрізнялася за віко-статевими характеристиками від груп дослідження, що дало змогу коректно їх порівнювати за іншими параметрами.

Дослідження виконали відповідно до етичних принципів Гельсінської декларації з дозволу комісії з біоетики ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Поверхневу цитоархітектоніку формених елементів крові й агрегатоутворення вивчили у венозній крові за допомогою мікроскопа Люмам І-2 («ЛОМО», РФ) у режимі фазового контрасту, використовуючи пристрій КФ-5 («ЛОМО», РФ).

Для ультраструктурного аналізу тромбоцитів 5 мл венозної крові центрифугували в гепаринізованій пробірці в режимі 900 об/хв протягом 15 хвилин при температурі 22 ± 2 °С. Фракцію збагаченої тромбоцитами плазми перенесли у префіксаційний розчин (у співвідношенні 1:5), який містив 0,1 % розчин глютарового альдегіду («SPI», США) в 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4) за кімнатної температури. Через 30 хвилин суспензію центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Осад із тромбоцитами використовували для виготовлення суспензії для дослідження надалі відповідно до рекомендацій С. L. Sawatzke, С. Solomons [8]. Зразки протягом 2 годин фіксували при +2 °С у 3 % розчині глютарового альдегіду, виготовленому на 0,2 М фосфатному буфері (рН 7,4). Матеріал перенесли для постфіксації в 1 % забуферений (рН 7,4) розчин тетроксиду осмію («SPI», США) на 1 годину. Зневоднювали зразки за допомогою пропіленоксиду в розчинах із концентрацією, котра зростає. Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епоналдит. Зрізи контрастували за Рейнольдсом за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Дослідження виконали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 («SELM», Україна) при напрузі прискорення 65–90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 20000. Загалом електронномікроскопічне дослідження виконали за стандартною схемою [9, 10].

Результати

У хворих на ЦД 1 типу у групі 1 за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії визначили помітну активацію тромбоцитів: частка активованих форм не була менше, ніж неактивованих клітин. Спостерігали велику кількість агрегованих і дегранульованих тромбоцитів унаслідок вивільнення переважно альфа-гранул, які у своєму складі поміж численних білкових молекул містять фібриноген і фактор Віллебранда. У складі тромбоцитарного пулу виявили поодинокі форми клітин із суттєвим дисбалансом альфа- та дельта-гранул,

а також змінами у вмісті лізосом та ультраструктурі мітохондрій. Це вказує на залучення механізмів утримування дельта-гранул у тромбоплазмі, що запобігає вивільненню неметаболічного АТФ, АДФ, серотоніну і кальцію у кров хворих на ЦД 1 типу за умов ШКФ ≥90 мл/хв/1,73 м² на тлі підвищеного рівня напруги гранулярного апарату тромбоцитів, який відповідає за реалізацію тромбоцитарного гемостазу. Спостерігали невелику кількість фрагментів тромбоцитів і псевдоподій (рис. 1).

У хворих на ЦД 2 типу групи 1 спостерігали велику кількість частково дегранульованих клітин із рештками лабільних гранул під цитолемою. Поряд з чималою кількістю агрегованих тромбоцитів визначили появу великих сферичних форм із наявністю новоутворених псевдоподій на поверхні, ознаками дестабілізації зовнішньої мембрани та суттєвим розширенням відкритої канальцевої системи. Кількість щільних тілець суттєво перевищувала вміст альфа-гранул. Також спостерігали істотне зниження вмісту нормальних дископодібних тромбоцитів унаслідок різкого збільшення кількості дискоехіноцитів, сфероцитів і сфероехіноцитів (рис. 2).

У венозній крові у складі циркуляційних агрегатів крові виявили чималу кількість функціонально активних поліморфноядерних лейкоцитів із розвинутими псевдоподіями, численними фагосомами та їхніми комплексами зі специфічними й неспецифічними гранулами. Тромбоцити агрегатів були переважно невеликими за розмірами, що вказувало на явища ретракції агрегованих мас унаслідок скорочення цитоплазматичних актоміозинових комплексів.

У хворих на ЦД 1 типу групи 2 виявили велику активацію тромбоцитарної ланки гемостазу, ушкодження поверхневих властивостей еритроцитів із залученням у патологічний процес лейкоцитів різних типів. Частка активованих тромбоцитів суттєво перевищувала рівень контрольної групи, також різко підвищеним був рівень агрегованих і дегранульованих форм. Ультраструктурне дослідження показало, що утворення дегранульованих форм відбувалося переважно шляхом вивільнення альфа-гранул, частково – за участю дельта-гранул і внаслідок зменшення вмісту мітохондрій. У складі тромбоцитарного пулу крові виявили обмежену кількість тромбоцитів з істотним дисбалансом альфа- і дельта-гранул, а також змінами у вмісті лізосом та ультраструктурі мітохондрій (рис. 3).

У хворих на ЦД 2 типу групи 2 у венозній крові спостерігали численні циркулюючі агрегати з наявністю великої кількості поліморфноядерних лейкоцитів із розвинутими псевдоподіями, численними фагосомами та їхніми комплексами. Тромбоцити агрегатів суттєво поступалися вільним циркулюючим формам за розмірами, що свідчило про помірний ступінь вторинної агрегації та ретракції агрегатів. Також спостерігали появу великих сферичних форм із наявністю новоутворених псевдоподій (рис. 4).

Кількість щільних тілець перевищувала вміст альфа-гранул, лізосом та мітохондрій спостерігали у значно меншій кількості порівняно з інтактними тромбоцитами. Дослідження показало незначний вміст

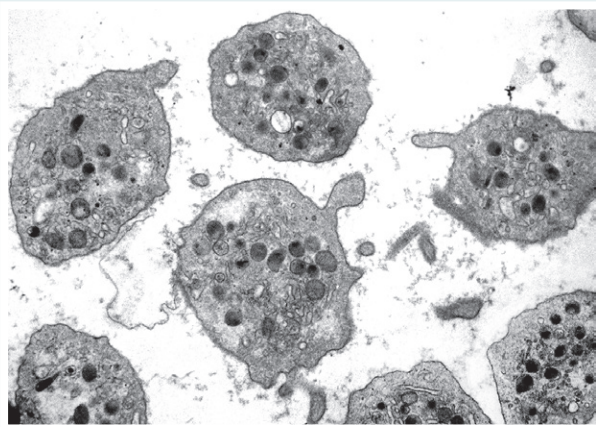


Рис. 1. Електронограма тромбоцитів хворих на ЦД 1 типу групи 1 (ШКФ ≥ 90 мл/хв/1,73 м²).

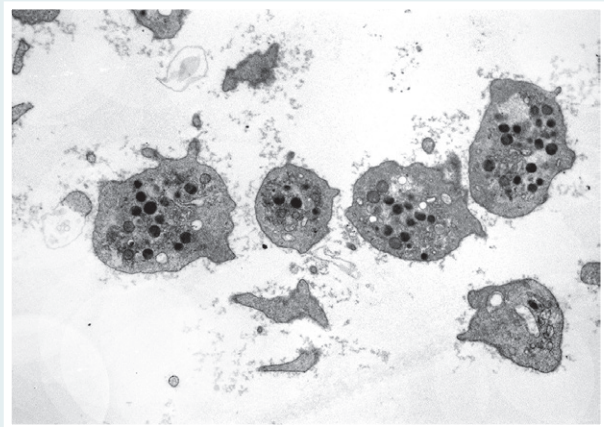


Рис. 2. Електронограма тромбоцитів хворих на ЦД 2 типу групи 1 (ШКФ ≥ 90 мл/хв/1,73 м²).

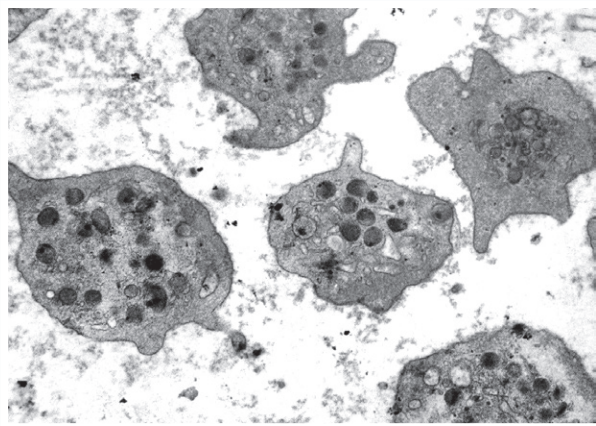


Рис. 3. Електронограма тромбоцитів хворих на ЦД 1 типу групи 2 (ШКФ 89–60 мл/хв/1,73 м²).

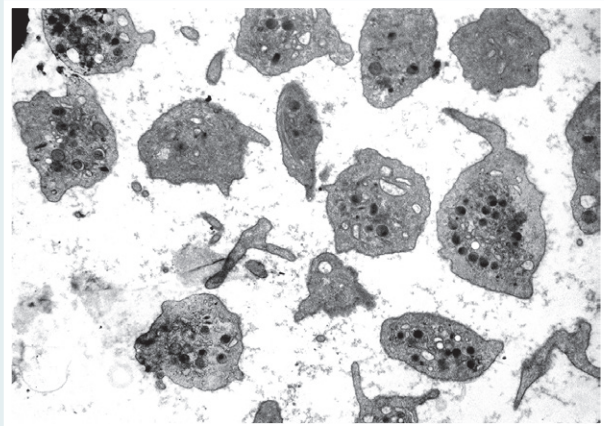


Рис. 4. Електронограма тромбоцитів хворих на ЦД 2 типу 2 групи (ШКФ 89–60 мл/хв/1,73 м²).

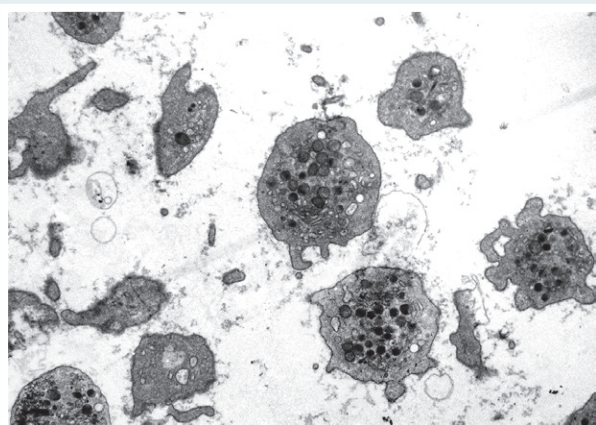


Рис. 5. Електронограма тромбоцитів хворих на ЦД 1 типу групи 3 (ШКФ 59–45 мл/хв/1,73 м²).

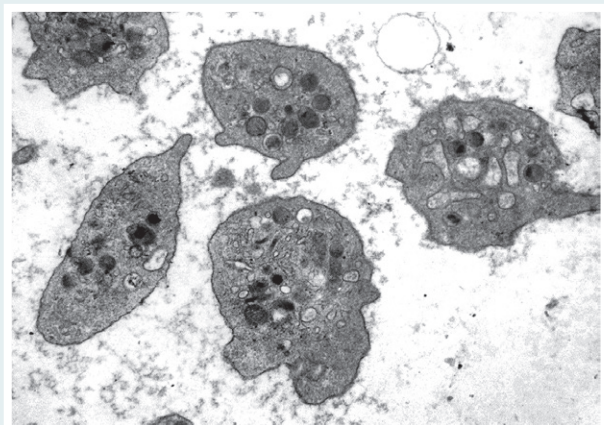


Рис. 6. Електронограма тромбоцитів хворих на ЦД 2 типу 3 групи (ШКФ 59–45 мл/хв/1,73 м²).

лейкоцитів у складних тромбоцитарних агрегатах, серед них переважали нейтрофільні гранулоцити. Їхня морфологія свідчила про суттєво підвищену функціональну активність: цитоплазма клітин характеризувалася гетероморфністю, клітини мали численні псевдоподії, кількість фагосом та їхніх комплексів зі специфічними та неспецифічними гранулами була

збільшеною, виявляли незрілі нейтрофіли. Поодинокі еозинофільні гранулоцити мали ознаки гіперактивації внаслідок утворення псевдоподій, значущої деформованості, редукції органел загального призначення. Специфічні еозинофільні гранули розташовувалися з незначною щільністю, часто на периферії клітин і свідчили про їхню зрілість. Отже, поряд зі змінами

нейтрофілів, що характерні для ендотеліальної дисфункції, ознаки гіперактивації еозинофілів вказували на розвиток внутрішньосудинного запалення, а їхня відносно невелика кількість у складі агрегатів – на обмеження участі еозинофілів як адаптивного регулятора запалення та як агента позаклітинного фібринолізу.

У складі тромбоцитарного пулу хворих на ЦД 1 типу групи 3 переважали форми з помітним дисбалансом альфа- і дельта-гранул, а також змінами у вмісті лізосом та ультраструктурі мітохондрій. У чималій кількості виявляли фрагменти тромбоцитів і розвинені псевдоподії на поверхні клітин. У більшості пацієнтів морфологія хромомера тромбоцитів свідчила про виразний ступінь порушень тромбоцитарного гемостазу. Також встановили суттєве ушкодження ультраструктури гіаломера більшості тромбоцитів. У складі збагаченої тромбоцитами фракції крові спостерігали зниження вмісту нормальних дископодібних тромбоцитів унаслідок різкого зростання кількості дискоехіноцитів, сфероцитів і сфероехіноцитів (рис. 5).

Поряд з високим рівнем агрегатів венозної крові та залученням до їхнього складу змінених лейкоцитів і еритроцитів ця обставина свідчить про суттєву патогенетичну роль агрегатоутворення в розвитку судинно-тромбоцитарних запальних і деструктивних ушкоджень. Необхідно зауважити: агрегати містили невеликі за розмірами тромбоцити, що вказувало на розвиток вторинної агрегації внаслідок їх ретракції та утворення численних тромбоцитарно-фібринових зв'язків.

У венозній крові хворих на ЦД 2 типу з рівнем ШКФ 59–45 мл/хв/1,73 м² визначили підвищений рівень агрегатоутворення; за морфологією великі за розмірами циркулювальні агрегати відповідали структурі складних утворень, що містили еритроцити та різні типи лейкоцитів. Велика кількість функціонально активних нейтрофілів із поліморфними ядрами та з розвинутими псевдоподіями, численними фагосомами та їхніми комплексами з тромбоцитарними гранулами свідчила про активний внутрішньосудинний запальний процес (рис. 6).

На розвиток запального процесу вказувала також чимала частка активованих еозинофільних гранулоцитів у складі агрегатів венозної крові та суттєву домішку еритроцитів. Поряд зі значно підвищеним рівнем агрегованих тромбоцитів спостерігали появу великих сферичних форм з наявністю новоутворених псевдоподій на поверхні, ознаками дестабілізації зовнішньої мембрани та суттєвим розширенням відкритої каналцевої системи. Мембрани каналців часто були фрагментованими, цитолема тромбоцитів втрачала суцільність у ділянках, що контактували з іншими клітинами у складі агрегатів. Тромбоцити у різних за розмірами агрегатах мали ознаки різкої ретракції, часто їхні мембрани зливалися, збережені ділянки щільно контактували між собою або з фібриновими структурами поблизу агрегатів.

Обговорення

Цукровий діабет – популяційна загроза, що призводить до ранньої інвалідазації та збільшення летальності, основною причиною яких є пізні судинні ускладнення,

передусім діабетична нефропатія з розвитком хронічної ниркової недостатності [11]. Характерний перебіг діабетичної хвороби нирок у хворих на ЦД полягає в поступовому наростанні альбумінурії та зниженні ШКФ, які використовують як критерії під час визначення стадій хронічної ниркової недостатності [12]. Незадовільні результати лікування пацієнтів із діабетичною нефропатією пов'язані з тривалим безсимптомним перебігом та пізньою діагностикою, тому своєчасний моніторинг функції нирок має вирішальне значення у хворих на ЦД для визначення початкових проявів ушкодження функції нирок.

Протягом останніх років визначили характер змін і структуру взаємозв'язків між маркерами ендотеліальної дисфункції та морфологічними ознаками ушкодження тромбоцитарної ланки гемостазу залежно від ступеня компенсації глікемії, враховуючи рівень альбумінурії у хворих на ЦД 2 типу [13]. Власні результати, а також результати закордонних дослідників вказують, що морфологічні ознаки порушення судинно-тромбоцитарного гемостазу є найбільш ранніми та інформативними для діагностики ушкодження ендотеліальної функції у хворих на ЦД 2 типу [1,3,14].

Кількісна характеристика морфологічних особливостей тромбоцитарного гемостазу, що наведена в попередніх роботах [15,16], показала найраніші прояви ушкодження структури тромбоцитів, які відбуваються за умов нормального рівня швидкості клубочкової фільтрації у хворих на ЦД 1 і 2 типів. Так, доведено, що підвищена дегрануляція альфа-гранул і збільшення вмісту циркулюючих тромбоцитарних агрегатів на тлі суттєвої активації тромбоцитів за галіновим типом є найчутливішими ознаками порушення гемостазу в пацієнтів без клінічних ознак діабетичної хвороби нирок.

За результатами дослідження, ступінь патоморфологічних змін тромбоцитів у хворих на ЦД 2 типу перевищує такий у групі хворих на ЦД 1 типу. З прогресуванням діабетичної нефропатії спостерігали суттєве поглиблення порушень тромбоцитарного гемостазу з залученням ультраструктурних ушкоджень еритроцитів і лейкоцитів, масивною дегрануляцією тромбоцитів, утворенням численних складних тромбоцитарних агрегатів, ущільненням кореляційних зв'язків між більшістю морфологічних параметрів, що характеризують гемостатичний профіль у хворих на ЦД 1 і 2 типів. Найважливішим підсумком цього циклу досліджень стало доведення, що морфологічні зміни тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД відбуваються ще до клінічних проявів діабетичної хвороби нирок і чітко корелюють із глибиною діабетичної нефропатії на етапах її розвитку.

Вивчення взаємозв'язку між комплексом клініко-лабораторних параметрів, що характеризують функцію нирок і ліпідемічний профіль у хворих на ЦД 1 типу, котре здійснене раніше [7,13,15,16], показало, що на сучасному рівні клінічної медицини ця проблема потребує нових діагностичних підходів. З'ясувалося, що використання тільки комплексу лабораторних параметрів, які характеризують стан нирок і ліпідемічний профіль з анамнестичними даними для визначення початкових проявів функціональної неспроможності нирок, не є достатнім. За цих умов предметом наукової дискусії стало питання про те,

наскільки зміни тромбоцитарного гемостазу можуть бути надійним критерієм для прогнозування розвитку порушень функції нирок, але порівняння цих змін при різних типах ЦД залежно від ШКФ на ультраструктурному рівні донині відсутнє.

У результаті роботи з'ясували: з прогресуванням ушкоджень фільтраційної функції нирок підвищується ступінь ушкодження мембранних структур тромбоцитів, збільшується кількість ознак гіперактивації тромбоцитів і частка незворотно трансформованих клітин. Виявили суттєвіші зміни тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД 2 типу порівняно з хворими на ЦД 1 типу. Визначили, що морфологічним субстратом ушкодження тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД 1 і 2 типів є посилення дестабілізації тромбоцитарних мембран, масивне агрегатоутворення з переважанням ущільнених агрегатів різних розмірів, залучення до їхнього складу незворотно деформованих еритроцитів і активованих лейкоцитів, дисбаланс щільності упаковки альфа-, дельта- і лямбда-гранул. Отже, названий ультраструктурний комплекс змін можна вважати раннім маркером прогресування діабетичної хвороби нирок у хворих на ЦД 1 і 2 типів.

На відміну від попередніх власних даних і результатів інших дослідників, у цій роботі наведені відомості про ультраструктурні перебудови клітинних і субклітинних компонентів судинно-тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД 1 і 2 типів у порівняльному аспекті з акцентом на їхньому прогностичному значенні щодо прогресування діабетичної хвороби нирок.

Висновки

1. У хворих на ЦД 1 типу з нормальним рівнем ШКФ і з рівнем ШКФ 89–60 мл/хв/1,73 м² агрегатоутворення відбувається за типом первинної агрегації, в основі якої – формування фібринових мостів між мембранними рецепторами сусідніх тромбоцитів. У хворих на ЦД 1 типу з рівнем ШКФ 59–45 мл/хв/1,73 м² розвивається вторинна агрегація через появу додаткових рецепторів до фібрину, залучення матеріалу дегранульованих грануломерів, підвищення концентрації кальцію та активацію тромбоцитарних актоміозинних комплексів.

2. У хворих на ЦД 2 типу з показником ШКФ 90 мл/хв/1,73 м² і вище помірний ступінь вторинної агрегації тромбоцитів супроводжується розвитком гіалінового типу морфологічної трансформації тромбоцитів. З прогресуванням ушкоджень фільтраційної функції нирок посилюються дестабілізація тромбоцитарних мембран, масивне агрегатоутворення з переважанням ущільнених агрегатів різних розмірів, залучення до їхнього складу незворотно деформованих еритроцитів та активованих лейкоцитів.

3. Цей ультраструктурний комплекс можна вважати раннім маркером прогресування діабетичної хвороби нирок у хворих на ЦД 1 і 2 типів.

Перспективи подальших досліджень пов'язані з аналізом взаємозв'язку між клініко-лабораторними та морфологічними критеріями, що визначають стан функції нирок, ендотеліальної функції та тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 28.02.2019

Після доопрацювання / Revised: 29.03.2019

Прийнято до друку / Accepted: 12.04.2019

Відомості про авторів:

Перцева Н. О., д-р мед. наук, професор, зав. каф. ендокринології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

ORCID ID: 0000-0002-5828-6270

Твердохліб І. В., д-р мед. наук, професор, зав. каф. гістології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

ORCID ID: 0000-0002-8672-3773

Чуб Д. І., аспірант каф. ендокринології, ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро.

ORCID ID: 0000-0002-6901-4051

Сведения об авторах:

Перцева Н. О., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. эндокринологии, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Твердохлеб И. В., д-р мед. наук, профессор, зав. каф. гистологии, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Чуб Д. И., аспирант каф. эндокринологии, ГУ «Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины», г. Днепро.

Information about authors:

Pertseva N. O., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Endocrinology, SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dnipro.

Tverdokhlib I. V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Histology, SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dnipro.

Chub D. I., PhD Student of the Department of Endocrinology, SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine", Dnipro.

Список літератури

- [1] Flow cytometric analysis of platelets type 2 diabetes mellitus reveals angry platelets / P. Soma et al. *Cardiovasc Diabetol.* 2016. Vol. 15. Issue 1. P. 52. doi: 10.1186/s12933-016-0373-x
- [2] Platelet Activation and Platelet-Leukocyte Aggregates in Type I Diabetes Mellitus / M. Z. Asmaa et al. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 2018. Vol. 24(9S). P. 230S–239S. doi: 10.1177/1076029618805861
- [3] Soma P., Pretorius E. Interplay between ultrastructural findings and atherothrombotic complications in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2015. Vol. 14. P. 96. doi: 10.1186/s12933-015-0261-9
- [4] Hvas A. M. Platelet Function in Thrombosis and Hemostasis. *Semin Thromb Hemost.* 2016. Vol. 42. Issue 3. P. 183–194. doi: 10.1055/s-0036-1572329
- [5] Gremmel T., Frelinger A. L., Michelson A. D. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016. Vol. 42. Issue 3. P. 191–204. doi: 10.1055/s-0035-1564835
- [6] Platelet hemostasis in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: cGMP- and NO-dependent mechanisms in the insulin-mediated platelet aggregation / T. E. Suslova et al. *Front Physiol.* 2014. Vol. 5. P. 501. doi: 10.3389/fphys.2014.00501
- [7] Перцева Н. О., Твердохліб І. В. Цукровий діабет 2 типу: ендотеліальна функція та тромбоцитарний гемостаз. Київ : Доктор-медіа, 2016. 420 с.
- [8] Sawatzke C. L., Solomons C. C. Fixation and embedding of small volumes of platelets for transmission electron microscopy. *J Clin Pathol.* 1980. Vol. 33. Issue 6. P. 600–602. doi: 10.1136/jcp.33.6.600
- [9] Hayat M. A. Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications. Cambridge : Cambridge University Press, 2000. 543 p.
- [10] Kuo J. Electron microscopy: methods and protocols. New York : Humana Press Springer, 2014. 608 p.
- [11] Leon B. M., Maddox T. M. Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes.* 2015. Vol. 6. Issue 13. P. 1246–1258. doi: 10.4239/wjcd.v6.i13.1246

- [12] Pretorius E., Mbotwe S., Kell D. B. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) reverses the amyloid state of fibrin seen in plasma of type 2 diabetics with cardiovascular co-morbidities. *Sci Rep*. 2017. Vol. 7. Issue 1. P. 9680. doi: 10.1038/s41598-017-09860-4
- [13] Перцева Н. О. Взаємозв'язок гіперглікемії з ендотеліальною функцією, функцією нирок, ліпідемічним профілем і морфологічними змінами формених елементів крові у хворих з недостатньою компенсацією цукрового діабету 2 типу з артеріальною гіпертензією. *Запорозький медичний журнал*. 2014. №6(87). С. 11–17. doi: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.6.35636>
- [14] Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients / A. Morel. *Mol Cell Biochem*. 2017. Vol. 430. Issue 1-2. P. 69–80. doi: 10.1007/s11010-017-2955-7
- [15] Pertseva N. O., Chub D., Tverdokhlebl I. Morphological Changes of Platelets as a Marker of Early Progression of Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2018. Vol. 67. Suppl. 1. P. 569. doi: 10.2337/db18-2194-PUB
- [16] Перцева Н. О., Твердохліб І. В., Чуб Д. І. Кількісна морфологічна характеристика тромбоцитарного гемостазу у хворих на цукровий діабет 1 та 2 типу в залежності від швидкості клубочкової фільтрації. *Morphologia*. 2018. Т. 12. №4. С. 64–72. doi: 10.26641/1997-9665.2018.4.64-72

References

- [1] Soma, P., Swanepoel, A. C., du Plooy, J. N., Mqoco, T., & Pretorius, E. (2016) Flow cytometric analysis of platelets type 2 diabetes mellitus reveals angry platelets. *Cardiovasc Diabetol*, 15(1), 52. doi: 10.1186/s12933-016-0373-x
- [2] Zahran, A. M., El-Badawy, O., Mohamad, I. L., Tamer, D. M., Abdel-Aziz, S. M., & Elsayh, K. I. (2018) Platelet Activation and Platelet–Leukocyte Aggregates in Type I Diabetes Mellitus. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 24(9S) 230S–239S. doi: 10.1177/1076029618805861
- [3] Soma, P., Pretorius, E. (2015) Interplay between ultrastructural findings and atherothrombotic complications in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*, 14, 96. doi: 10.1186/s12933-015-0261-9
- [4] Hvas, A. M. (2016) Platelet Function in Thrombosis and Hemostasis. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 183–194. doi: 10.1055/s-0036-1572329
- [5] Gremmel, T., Frelinger, A. L., & Michelson, A. D. (2016) Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 191–204. doi: 10.1055/s-0035-1564835
- [6] Suslova, T. E., Sitozhevskii, A. V., Ogurkova, O. N., Kravchenko, E. S., Kologrivova, I. V., Anfinogenova, Y., & Karpov, R. S. (2014) Platelet hemostasis in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: cGMP- and NO-dependent mechanisms in the insulin-mediated platelet aggregation. *Front Physiol*, 5, 501. doi: 10.3389/fphys.2014.00501
- [7] Pertseva, N. O., & Tverdokhlebl, I. V. (2016) *Tsukrovyyi diabet 2 typu: endotelialna funktsiia ta trombocytny hemostaz [Type 2 diabetes mellitus: endothelial function and platelet hemostasis]*. Kyiv: Doktor-media grup. [in Ukrainian].
- [8] Sawatzke, C. L., & Solomons, C. C. (1980) Fixation and embedding of small volumes of platelets for transmission electron microscopy. *J Clin Pathol*, 33(6), 600–602. doi: 10.1136/jcp.33.6.600
- [9] Hayat, M. A. (2000) Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications. Cambridge: Cambridge University Press.
- [10] Kuo, J. (2014) Electron microscopy: methods and protocols. New York : Humana Press Springer.
- [11] Leon, B. M., & Maddox, T. M. (2015) Diabetes and cardiovascular disease: epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*, 6(13), 1246–1258. doi: 10.4239/wjcd.v6.i13.1246
- [12] Pretorius, E., Mbotwe, S., & Kell, D. B. (2017) Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) reverses the amyloid state of fibrin seen in plasma of type 2 diabetics with cardiovascular co-morbidities. *Sci Rep*, 7(1), 9680. doi: 10.1038/s41598-017-09860-4
- [13] Pertseva, N. O. (2014) Vzaïmozv'язok hiperhlikemii z endotelialnoiu funktsieiu, funktsieiu nyrok, lipidemichnym profilem i morfolohichnymy zminamy formenykh elementiv krovi u khvorykh z nedostatnoiu kompensatsieiu tsukrovoho diabetu 2 typu z arterialnoiu hipertenzieiu [Relationship of hyperglycemia with endothelial function, renal function, lipidemic profile, and morphological changes of blood cells in patients with insufficient compensation of type 2 diabetes mellitus with hypertension]. *Zaporozhye medical journal*, 6(87), 11–17. [in Ukrainian]. doi: <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2014.6.35636>
- [14] Morel, A., Rywaniak, J., Bijak, M., Miller, E., Niwald, M., & Saluk, H. (2017) Flow cytometric analysis reveals the high levels of platelet activation parameters in circulation of multiple sclerosis patients. *J Mol Cell Biochem*, 430(1-2), 69–80. doi: 10.1007/s11010-017-2955-7
- [15] Pertseva, N., Chub, D., & Tverdokhlebl, I. (2018) Morphological Changes of Platelets as a Marker of Early Progression of Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 67 (Suppl. 1), 569. doi: 10.2337/db18-2194-PUB