

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 OsO<sub>4</sub> 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  $\phi$  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, мкм <sup>2</sup>	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  $\alpha$ -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,  $\beta$ -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  $35,2 \pm 3,3$  мкм<sup>2</sup>. 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  $\alpha$ -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 –  $35,8 \pm 3,1$  мкм<sup>2</sup> (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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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

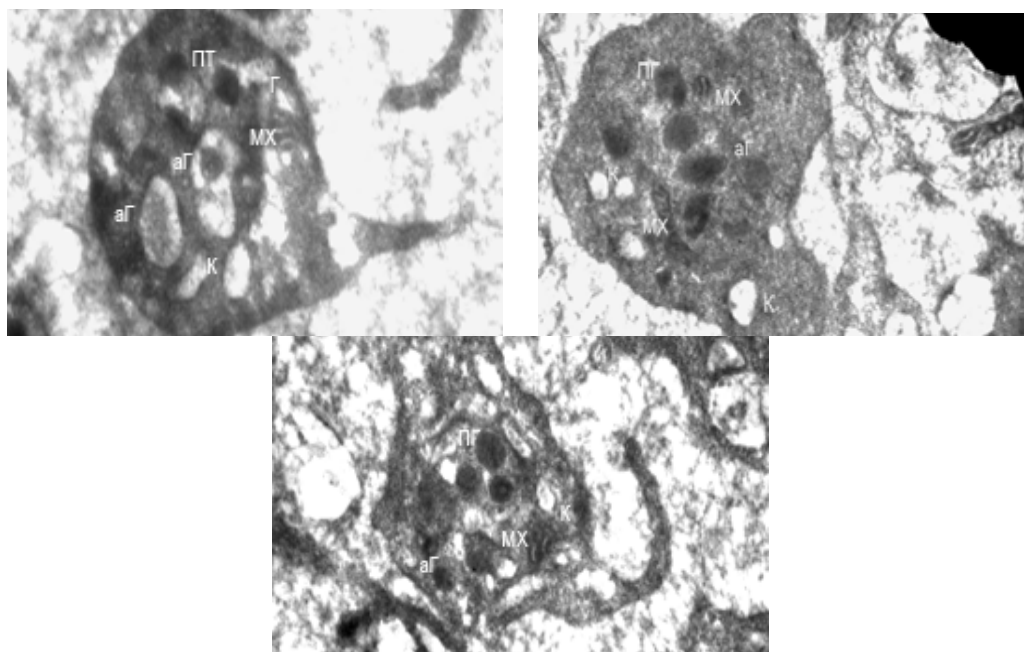


Рис. 1. Ультраструктура тромбоцитов в контрольной группе (1 подгруппа). МХ – митохондрии, ПГ – плотные гранулы (плотные тельца), К – система канальцев, аГ –  $\alpha$ -гранулы.  $\times 12000$ .

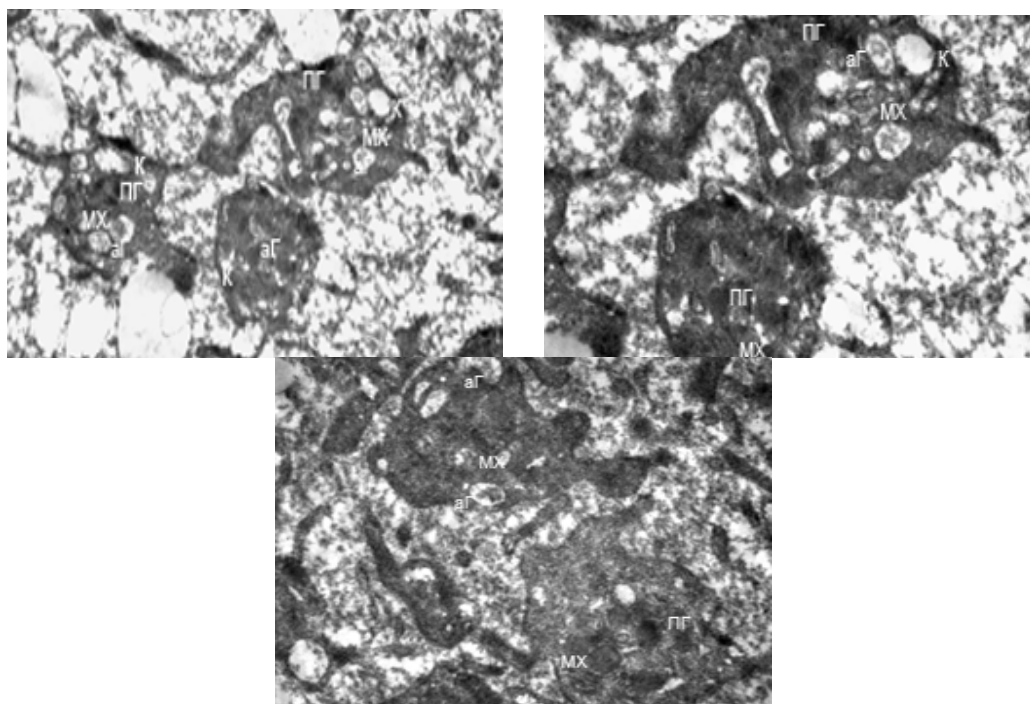


Рис. 2. Ультраструктура тромбоцитов после гипоксической нагрузки (2 подгруппа). МХ – митохондрии, ПГ – плотные гранулы (плотные тельца), К – система канальцев, аГ –  $\alpha$ -гранулы.  $\times 9600$ .

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).

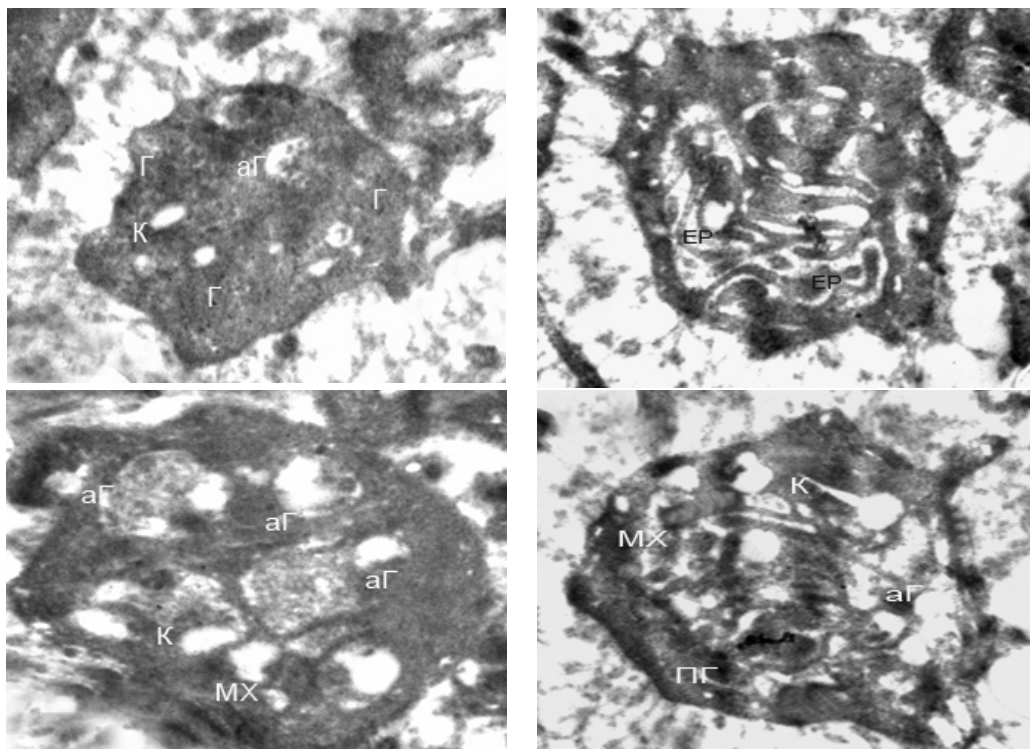


Рис. 3. Ультраструктура тромбоцитов в группе после пребывания в Антарктике (подгруппа 3). МХ – митохондрии, ПГ – плотные гранулы (плотные тельца), К – система канальцев, аГ –  $\alpha$ -гранулы, Г – гранулы гликогена, ЕР – эндоплазматичный ретикулум. х 18000.

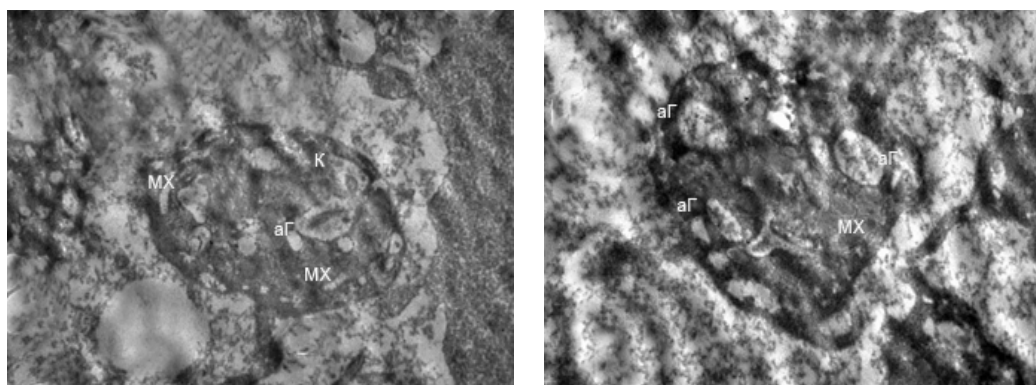


Рис. 4. Ультраструктура тромбоцитов в крови зимовщиков после пребывания в Антарктике и гипоксической нагрузки (подгруппа 4). МХ – митохондрии, аГ –  $\alpha$ -гранулы. х 12000.

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).

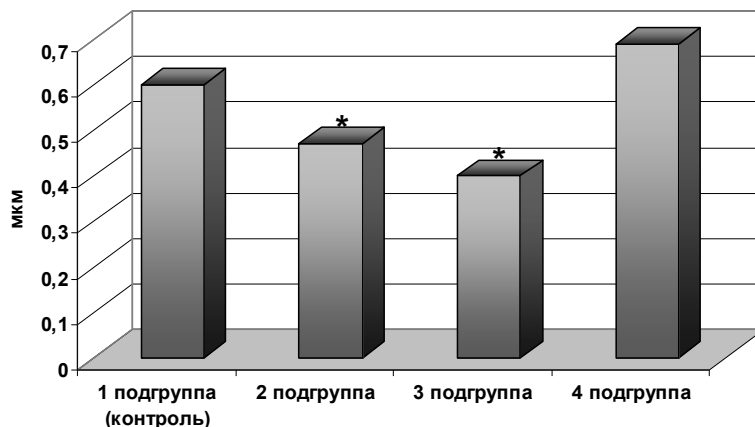


Рис. 5. Изменение диаметра митохондрий у лиц обследуемых подгрупп.

\* – 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.