

Н.О.Перцева

ДЗ «Дніпропетровська  
медична академія МОЗ  
України»

**Ключові слова:** цукровий діабет 2 типу, артеріальна гіпертензія, ендотеліальна дисфункція, тромбоцитарний гемостаз, взаємозв'язок.

Надійшла: 28.01.2015

Прийнята: 07.03.2015

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.1.62-71>

УДК 616.155.1-008.64:616.1-06

## ЗВ'ЯЗОК МОРФОЛОГІЧНИХ ЗМІН ФОР- МЕНИХ ЕЛЕМЕНТІВ КРОВІ З ЕНДОТЕ- ЛІАЛЬНОЮ ФУНКЦІЄЮ, ФУНКЦІЄЮ НИРОК І ЛІПІДЕМІЧНИМ ПРОФІЛЕМ У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ 2 ТИПУ З СУБОПТИМАЛЬНИМ ГЛІКЕМІЧНИМ КОНТРОЛЕМ І АРТЕРІАЛЬНОЮ ГІПЕР- ТЕНЗІЄЮ

**Реферат.** Потребують з'ясування і подальшої розробки численні питання щодо зв'язків між ендотеліальною дисфункцією та морфологічним субстратом ушкодження гемостазу, що відбуваються при розвитку цукрового діабету 2 типу у поєднанні з артеріальною гіпертензією. У 87 хворих даного контингенту з субоптимальним контролем глікемії за допомогою клініко-лабораторних, морфологічних методів і кореляційного аналізу було визначено зв'язки між ендотеліальною дисфункцією, ступенем ушкодження функції нирок, ліпідемічним профілем і морфологічними змінами судинно-тромбоцитарного гемостазу. Встановлено, що на тлі значного посилення зв'язків між показниками ендотеліальної дисфункції й ушкодженій тромбоцитарної ланки гемостазу утворюються достовірні кореляції ультраструктурних характеристик тромбоцитів з клініко-лабораторними ознаками нефропатичних і дисліпідемічних змін.

**Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 1. – С. 62-71.

© Н.О.Перцева, 2016

✉ [npertseva@dsma.dp.ua](mailto:npertseva@dsma.dp.ua)

**Pertseva N.O. Relationship of morphological changes of blood cells with endothelial function, renal function and lipidemic profile in patients with type 2 diabetes mellitus with suboptimal glycemic control and hypertension.**

**ABSTRACT. Background.** Many questions about the relationship between endothelial dysfunction and morphological substrate of hemostasis damage that occur during the progress of type 2 diabetes mellitus and arterial hypertension require clarification and further advance. **Objective.** The aim of this study is to determine the relationships between endothelial dysfunction, the degree of renal function damage, lipidemic profile and morphological changes of vascular-platelet hemostasis in patients with type 2 diabetes mellitus with suboptimal glycemic control and hypertension. **Methods.** In 87 patients with insufficient glycemic compensation using clinical, laboratory, morphological methods and correlational analysis were identified association between endothelial dysfunction, degree of renal function damage, lipidemic profile and morphological changes of vascular-platelet hemostasis. **Results.** Against the background of insufficient glycemic compensation glycosylated hemoglobin concentration tightly correlated with the share of activated platelets ( $r=+0.77$ ;  $p<0.05$ ), with the level of aggregated forms ( $r=+0.82$ ;  $p<0.05$ ) and the concentration of small blood platelet aggregates ( $r=+0.76$ ;  $p<0.05$ ), established a positive relationship with the share degranulated platelets ( $r=+0.60$ ;  $p<0.05$ ). Signs of atherogenic dyslipidemia triad that this contingent of patients indicated significant deviation from that of the control group not only had a correlation with the share of activated platelets and content of alpha and delta granules, but also formed a new moderate strength correlations with other observable parameters of platelet morphology. In particular, amid insufficient glycemic compensation formed reliable values of the coefficients of linear correlation in pairs: total cholesterol and activated platelets ( $r=-0.54$ ), low density lipoprotein cholesterol and activated platelets ( $r=-0.51$ ), low density lipoprotein cholesterol and aggregated forms ( $r=+0.59$ ), low density lipoprotein cholesterol and degranulated platelets ( $r=+0.48$ ). Also triglycerides level in these patients established statistically significant correlation with all studied parameters of intravascular platelet activation. **Conclusion.** It has been established that in the insufficient glycemic control by a significant strengthening relationships between indicators of endothelial dysfunction and damaged platelet hemostasis formed significant correlations of ultrastructural characteristics of platelets with clinical and laboratory signs of nephropathy and dyslipidemic changes.

**Key words:** diabetes mellitus type 2, hypertension, endothelial dysfunction, platelet hemostasis, relationship.

### Citation:

Pertseva NO. [Relationship of morphological changes of blood cells with endothelial function, renal function and lipidemic profile in patients with type 2 diabetes mellitus with suboptimal glycemic control and hypertension]. *Morphologia*. 2016;10(1):62-71. Ukrainian.

## Вступ

За умов прогнозованого зростання числа хворих на цукровий діабет (ЦД) 2 типу у поєднанні з артеріальною гіпертензією (АГ) пошук оптимальних методів контролю АГ та супутніх станів представляється особливо актуальним [1, 2]. У сучасних умовах профілактика мікро- і макросудинних ускладнень у цих хворих полягає в інтенсивній корекції багатьох розладів, найважливішими з яких виступають дисфункція ендотелію [3, 4] та ушкодження судинно-тромбоцитарного гемостазу [5].

При ендотеліальній дисфункції, яка характеризується порушенням всіх регуляторних властивостей стінки судин, знижується утворення NO, активується синтез і секреція ендотеліну-1, збільшуються концентрації фактора Вілебранда, інгібітора активатора плазміногену-1 і тромбомодуліну, а також активуються процеси перекисного окислення ліпідів [6]. Важливу роль у патогенезі діабетичних порушень відіграють зміни системи гемостазу та порушення реологічних функцій – ендотелію судин, тромбоцитів, фібринолізу та гемокоагуляції [7]. Виразні гемореологічні дефекти визначаються вже на ранніх стадіях діабетичної ангіопатії та характеризуються підвищенням в'язкості крові, плазми та агрегаційної здатності еритроцитів і тромбоцитів, а також фібринолітичної активності плазми [8].

Гіперліпідемія й дисліпопротеїнемія погіршують реологічні властивості крові, що веде до вповільнення кровообігу й посилення агрегації тромбоцитів. Однією з патогенетичних ланок змін реологічного статусу крові є дестабілізація еритроцитів і тромбоцитів, що виникає при ЦД внаслідок неензиматичного глікування білків, ослаблення антиоксидантних систем та активації перекисного окислення в мембрані клітин [9]. Деендотелізація судин з оголенням базальної мембрани й нагромадження продуктів розпаду клітин, фібрину, еритроцитарних складів, продуктів гемолізу еритроцитарних речовин і інших факторів, що підвищують внутрішньосудинну агрегацію тромбоцитів, призводять до розвитку хронічного дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові та інших ускладнень [10, 11].

Сучасні уявлення про патогенез формування та розвитку ендотеліальної дисфункції носять фрагментарний характер і стосуються переважно впливу окремих факторів: гіперхолестеринемії, гіперглікемії, високої напруги гемодинамічного зсуву [8]. Крім того, відсутнє чітке уявлення про поєднаний вплив метаболічних і гемодинамічних факторів на функціональний стан ендотелію при ЦД 2 типу в поєднанні з АГ. Потребують з'ясування й подальшої розробки ті численні питання, які пов'язані з аналізом зв'язку між ендотеліальною дисфункцією та морфологічним субстратом ушкодження гемостазу, що відбуваються при розвитку даної патології та її ускладнень.

**Метою** даного дослідження є визначення зв'язків між ендотеліальною дисфункцією, ступенем ушкодження функції нирок, ліпідемічним профілем і морфологічними змінами судинно-тромбоцитарного гемостазу у хворих на цукровий діабет 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і артеріальною гіпертензією.

## Матеріали та методи

Клініко-лабораторне і морфологічне дослідження проведено у 87 хворих на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем (концентрація глікованого гемоглобіну від 7% до 8%) і гіпертонічною хворобою з АГ 1-3 ступенів (жінок – 73, чоловіків – 14). Верифікацію діагнозів проводили згідно наказів МОЗ України №436 від 03.07.2006 р. і №1118 від 21.12.2012 р. Пацієнти були розподілені на основну групу (45 осіб, середній вік  $60,7 \pm 4,8$  років) і групу порівняння (42 особи, середній вік  $63,0 \pm 5,3$  років). В обох групах лікування АГ проводили із застосуванням тіазидоподібних діуретиків, інгібіторів ангіотензінперетворюючого фермента, блокаторів  $\beta$ -адренорецепторів, антагоністів кальцію, що призначалися індивідуалізовано у необхідних дозах. До основної групи увійшли пацієнти, у яких до антигіпертензивної терапії був залучений антагоніст рецепторів ангіотензину II лозартан (Лозап®, Zentiva). Групи хворих були співставними за віком, статтю, індексом маси тіла, тривалістю АГ і ЦД. У контрольній групі (28 волонтерів – практично здорових осіб) вік та індекс маси тіла також не відрізнялися статистично вагомо від показників у хворих досліджуваних клінічних груп. Всі дослідження проводили у відповідності з етичними принципами Гельсінської Декларації з дозволу комісії з біоетики ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України».

Крім загальноклінічного обстеження і визначення рівня глікованого гемоглобіну (HbA1c), проводили дослідження таких спеціальних клініко-лабораторних параметрів: концентрації маркерів ендотеліальної дисфункції (ендотеліну-1, фактора Вілебранда і тромбомодуліну); наявність мікроальбумінурії (МАУ); швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ); рівні сечовини і креатиніну; концентрації загального холестерину, холестерину ліпопротеїдів високої і низької щільності (ЛПВЩ і ЛПНЩ), а також тригліцеридів. Клініко-лабораторні дослідження проводили у відповідності з рекомендаціями фірмовиробників діагностичних тест-систем на ґрунті сучасних принципів лабораторних технологій [12]. ШКФ розраховували за формулою MDRD (Modification of Diet in Renal Disease Study). Імуноферментний аналіз маркерів ендотеліальної дисфункції проводили на базі Діагностичного центру ТОВ «Аптеки медичної академії» (м.Дніпропетровськ) за допомогою наборів реактивів виробництва «Technoclone GmbH» та «Biomedica Medizinprodukte» (Австрія).

Для ультраструктурного аналізу тромбоцитів фракцію збагаченої тромбоцитами плазми використовували для подальшого дослідження у відповідності з рекомендаціями [13]. Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епон-аралдїт. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікромомі УМТП-6М ("SELMI", Україна). Дослідження проводили за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 ("SELMI", Україна) при напрузі прискорення 65-90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 80000. У цілому, електронномікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою [14]. Вивчення поверхневої цитоархітектоники еритроцитів і тромбоцитів венозної крові проводили за допомогою мікроскопа Люмам И-2 («ЛЮМО», Росія) у режимі фазового контрасту при використанні пристрою КФ-5. Морфологічне типування формених елементів крові здійснювали за рекомендаціями [15].

Статистичну обробку результатів виконували з використанням пакетів ліцензійних програм Statistica 6.1 і SPSS 13.0. Визначення вірогідності розходжень між вибірками проводили з урахуванням парного t-критерію Стьюдента, а також непараметричного критерію Вілкоксона у разі відсутності нормального статистичного розподілу. Оцінку відповідності розподілу величин нормальному (Гауса) проводили за допомогою визначення коефіцієнтів ексцесу та асиметрії з використанням відповідних таблиць [16]. Парний кореляційний аналіз проводили на основі обчислення коефіцієнта лінійної кореляції Пірсона (нормальний розподіл) або коефіцієнта рангової

кореляції Спірмена (асиметричний розподіл) з наступним визначенням ступеня його статистичної значущості [16].

#### Результати та їх обговорення

Визначення клініко-лабораторних параметрів показало, що концентрація HbA1c у даних пацієнтів коливалась у межах від 7% до 8% і достовірно перевищувала середній рівень групи контролю на 63,8% (група порівняння) і на 66,4% (основна група), що відповідало критеріям субоптимального глікемічного контролю. Антигіпертензивна дія попередньої терапії дозволила досягти цільових значень артеріального тиску (АТ) (нижче за 130/80 мм.рт.ст.) у 56 (64,4%) хворих з 87 обстежуваних пацієнтів даного контингенту, що суттєво не розрізнялось між досліджуваними клінічними групами. При цьому рівні САТ (на відміну від ДАТ) позитивно корелювали з концентрацією глікованого гемоглобіну ( $r=+0,58$ ;  $p<0,05$ ). У свою чергу, вміст HbA1c знаходився у щільному прямому зв'язку з показниками ендотеліальної функції, рівнем альбумінурії, концентраціями загального холестерину і ЛПНЩ, а також ступенем гіпертригліцеридемії.

У хворих основної клінічної групи виявлялися різко підвищені рівні ендотеліну-1 (у 11,2 рази), фактора Вілебранда (у 3,9 рази) і тромбомодуліну (у 3,1 рази) відносно значень групи контролю. Аналогічні зміни спостерігалися у групі порівняння (табл. 1). Ступінь змін рівнів маркерів ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з субоптимальним глікемічним контролем свідчив про залежність ушкодження ендотелію від концентрації глікованого гемоглобіну.

Таблиця 1

Стан клініко-лабораторних параметрів у контрольній групі та у хворих на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і АГ,  $M \pm m$

Параметри	Група контролю	Група порівняння	Основна група
HbA1c (%)	4,61 ± 0,23	7,55 ± 0,38*	7,66 ± 0,29*
САТ (мм.рт.ст.)	122,5 ± 6,9	138,2 ± 8,7	138,4 ± 7,3
ДАТ (мм.рт.ст.)	75,2 ± 7,8	82,5 ± 6,0	79,8 ± 5,6
Ендотелін-1 (фмоль/мл)	0,19 ± 0,06	2,03 ± 0,44*	2,12 ± 0,56*
Фактор Вілебранда (од/мл)	0,63 ± 0,09	2,37 ± 0,23*	2,43 ± 0,30*
Тромбомодулін (нг/мл)	2,62 ± 0,48	8,14 ± 1,12*	8,23 ± 1,31*
Гемоглобін (г/л)	141,2 ± 12,7	140,5 ± 11,3	134,2 ± 8,5
Рівень альбумінурії (мг/л)	8,1 ± 1,3	29,7 ± 3,8*	29,5 ± 4,1*
ШКФ (мл/хв)	98,1 ± 10,8	83,1 ± 6,5	78,7 ± 7,8
Сечовина (ммоль/л)	5,62 ± 0,96	5,63 ± 0,83	6,07 ± 0,72
Креатинін (ммоль/л)	63,2 ± 8,8	79,4 ± 8,1	79,8 ± 8,7
Загальний холестерин (ммоль/л)	4,10 ± 0,62	5,62 ± 0,35	5,70 ± 0,66
ЛПВЩ (ммоль/л)	1,61 ± 0,35	1,11 ± 0,24	1,23 ± 0,30
ЛПНЩ (ммоль/л)	2,10 ± 0,41	3,44 ± 0,43*	3,54 ± 0,32*
Тригліцериди (ммоль/л)	1,39 ± 0,18	2,50 ± 0,36*	2,38 ± 0,29*

Примітка: \* – достовірна відмінність від групи контролю ( $p<0,05$ ).

Крім того, означені маркери посилювали достовірну кореляцію між собою, а також встанов-

лювали позитивний зв'язок із значеннями артеріального тиску, рівнем альбумінурії і показника-

ми ліпідемічного профілю, що відображає поглиблення взаємодії різних патогенетичних ланок розвитку хвороби у даного контингенту хворих за умов субоптимального глікемічного контролю.

Клініко-лабораторні показники функції нирок у пацієнтів з ЦД 2 типу і АГ свідчили про помірні нефропатичні зміни у даних хворих і суттєво не розрізнялися між двома досліджуваними клінічними групами. МАУ спостерігалась у 45 (51,7%) пацієнтів. При цьому середній рівень альбумінурії у 3,7 рази (група порівняння) та у 3,6 рази (основна група) перевищував контрольні значення. Макроальбумінурія спостерігалась у 2 (2,3%) хворих. ШКФ коливалась у межах від 60 мл/хв до 89 мл/хв у розрахунку за формулою MDRD, тобто відповідала незначно зниженому рівню. Середні значення показника в обох клінічних групах не мали вірогідних відрізень від контрольної групи. Концентрації сечовини і креатиніну, широко варіюючи, у більшості хворих не перевищували верхньої межі референсного інтервалу і також суттєво не відрізнялись від контрольних значень (табл. 1).

Парний кореляційний аналіз виявив суттєві особливості у структурі зв'язків між показниками функції нирок і іншими досліджуваними параметрами. Зокрема, між собою показники функції нирок встановлювали достовірні кореляції у парах: МАУ і ШКФ ( $r=-0,57$ ), ШКФ і креатинін ( $r=-0,55$ ). Посилювалися зв'язки між МАУ і рівнем сечовини ( $r=+0,83$ ), між МАУ і концентрацією креатиніну ( $r=+0,69$ ). Також рівень альбумінурії утворював або посилював позитивний кореляційний зв'язок з концентрацією HbA1c, рівнем САТ, концентраціями всіх досліджуваних маркерів ендотеліальної дисфункції.

Зважаючи на те, що альбумінурія перевищувала рівень 20 мг/л більш ніж у половини хворих даної клінічної групи, посилення існуючих та встановлення нових кореляційних зв'язків МАУ з означеними клініко-лабораторними параметрами свідчить про підвищення патогенетичної ролі МАУ в розвитку хвороби і, зокрема, про зростання взаємозв'язку між рівнем альбумінурії і ступенем ушкодження ендотеліальної функції на тлі субоптимального контролю глікемії.

Визначення загального холестерину крові не виявило достовірних відрізень від середніх значень контрольної групи, проте у більшості обстежуваних спостерігалось перевищення цільових значень, передбачуваних рекомендаціями ESC (2007). У даних пацієнтів рівень холестерину ЛПНЩ був підвищеним на 63,8% ( $p<0,05$ ) у хворих групи порівняння і на 68,6% ( $p<0,05$ ) у пацієнтів основної групи, в той час як концентрація холестерину ЛПВЩ залишалась без істотних змін відносно групи контролю. У більшості хворих визначалась гіпертригліцеридемія. Середній рівень тригліцеридів у групі порівняння на

79,9% ( $p<0,05$ ) перевищував контрольні значення, в основній групі хворих – на 71,2% ( $p<0,05$ ).

За результатами кореляційного аналізу, всі показники ліпідемічного профілю встановлювали тісний зв'язок між собою. Спостерігалися достовірні позитивні кореляції рівня загального холестерину з HbA1c ( $r=+0,69$ ), САТ ( $r=+0,49$ ), маркерами ендотеліальної дисфункції ( $r$  від  $+0,52$  до  $+0,68$ ), концентрацією сечовини крові ( $r=+0,48$ ) і ступенем МАУ ( $r=+0,51$ ). Аналогічні за структурою та інтенсивністю зв'язки виявлялися також при розрахунку кореляційної матриці по концентраціях холестерину ЛПНЩ і тригліцеридів. Наведені дані свідчать про зростання взаємної ініціалізації патогенетичних механізмів поглиблення дисліпідемії у пацієнтів даного контингенту за умов субоптимального глікемічного контролю.

За допомогою трансмісійної електронної та фазово-контрастної мікроскопії було виявлено значну активацію тромбоцитарної ланки гемостазу, ушкодження тинкторіальних властивостей еритроцитів із залученням до патологічного процесу лейкоцитів різних типів. Частка активованих тромбоцитів у даного контингенту хворих перевищувала рівень контрольної групи майже у 2,5 рази. Також різко підвищеним виявлявся рівень агрегованих і дегранульованих форм – до майже 3-разового переважання (табл. 2). За рахунок цього вміст неактивованих тромбоцитів крові пацієнтів у групі порівняння поступався контрольному показнику на 46,5% ( $p<0,05$ ), в основній групі – на 45,2% ( $p<0,05$ ).

За даними фазово-контрастної мікроскопії, кількість малих тромбоцитарних агрегатів у 3,6 рази (група порівняння) і 3,7 рази (основна група) перевищувала показник групи контролю. Крім того, у хворих даного контингенту з'являлися середні та великі агрегати, які у ряді випадків містили домішок з лейкоцитів і еритроцитів. Присутність незрілих форм нейтрофілів свідчила про ушкодження ендотеліальної функції, а також про перебіг активного внутрішньосудинного запального процесу.

Утворення дегранульованих форм відбувалося переважно за рахунок вивільнення альфа-гранул, що містять фібриноген і фактор Вілебранда, а також частково за участю дельта-гранул і зменшення вмісту мітохондрій. Ступінь означених патоморфологічних змін значною мірою залежав від рівня альбумінурії. На початкових етапах дослідження у складі тромбоцитарного пулу крові у хворих обох клінічних груп з нормальбу- мінурією виявлялася обмежена кількість тромбоцитів з істотним дисбалансом альфа- і дельта-гранул, а також змінами у вмісті лізосом та ультраструктурі мітохондрій. Фрагменти тромбоцитів та псевдоподії спостерігались у помірній кількості. У переважній більшості пацієнтів морфологія хромомера тромбоцитів свідчила про

обмежено розвинутий ступінь порушень тромбоцитарного гемостазу (рис. 1).

Таблиця 2

Стан морфологічних параметрів крові у контрольній групі та у хворих на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і АГ,  $M \pm m$

Параметри	Група контролю	Група порівняння	Основна група
Неактивовані тромбоцити (%)	75,5 ± 9,3	40,4 ± 5,1*	41,2 ± 4,3*
Агреговані тромбоцити (%)	6,8 ± 0,82	16,8 ± 2,0*	17,1 ± 1,9*
Дегранульовані форми (%)	6,3 ± 1,1	18,3 ± 2,7*	18,6 ± 2,2*
Активовані тромбоцити (%)	24,5 ± 1,9	59,6 ± 6,9*	58,8 ± 7,6*
Альфа-гранули (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> )	0,108±0,031	0,061±0,012*	0,064±0,009*
Дельта-гранули (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> )	0,037±0,012	0,027±0,011	0,028±0,007
Лямбда-гранули (мкм <sup>2</sup> )	0,142±0,037	0,106±0,023	0,108±0,031
Мітохондрії (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>3</sup> )	0,024±0,008	0,014±0,003*	0,013±0,003*
Дискоцити (%)	83,4 ± 4,8	58,1 ± 4,5*	57,8 ± 6,1*
Дискоехіноцити (%)	11,6 ± 4,2	26,7 ± 2,1*	26,1 ± 2,7*
Сфероцити (%)	2,91 ± 0,70	6,31 ± 0,9*	6,19 ± 0,8*
Сфероехіноцити (%)	1,68 ± 0,33	2,78 ± 0,42*	2,83 ± 0,37*
Біполярні тромбоцити (%)	0,53 ± 0,18	0,94 ± 0,31	0,91 ± 0,18
Активні тромбоцити (%)	16,6 ± 2,2	40,2 ± 5,3*	41,6 ± 4,5*
Малі тромбоцитарні агрегати	3,10 ± 0,71	11,26 ± 1,36*	11,42 ± 1,39*
Великі тромбоагрегати	0,17 ± 0,02	2,33 ± 0,27*	2,40 ± 0,19*
Нормальні еритроцити (%)	87,53 ± 0,94	84,11 ± 1,16	83,93 ± 2,02
Зворотно змінені (%)	9,52 ± 0,87	12,83 ± 0,75*	12,96 ± 0,90*
Незворотно змінені (%)	2,74 ± 0,19	3,06 ± 0,24*	3,11 ± 0,26*

Примітка: \* – достовірна відмінність від групи контролю ( $p < 0,05$ ).

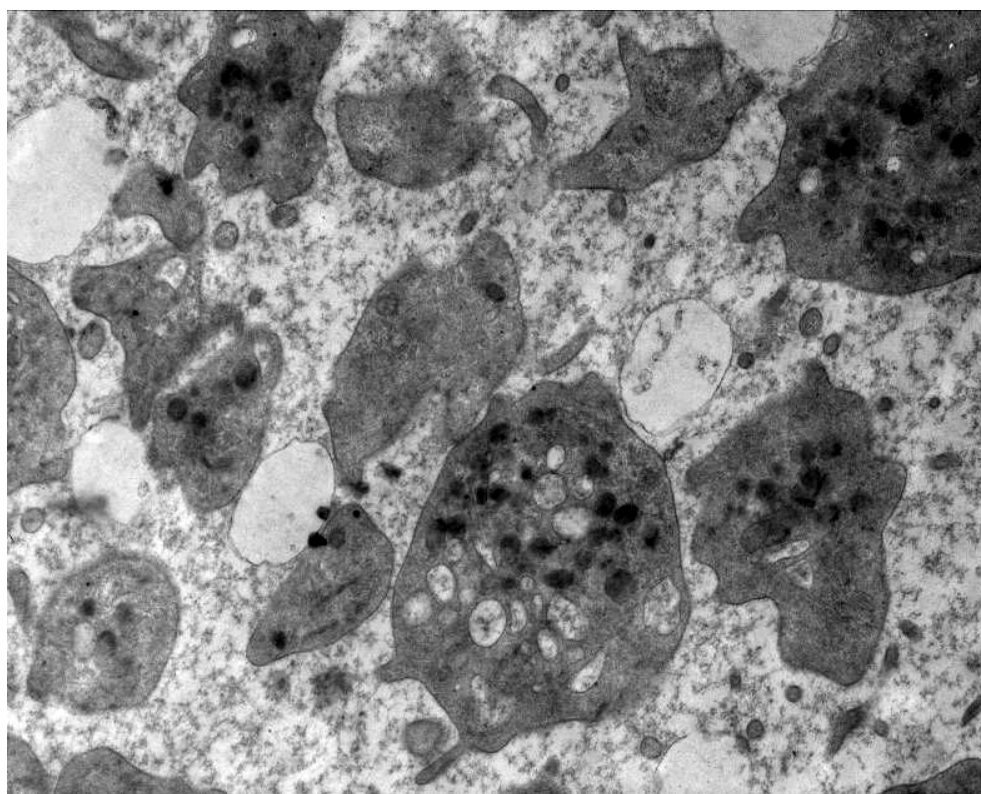


Рис. 1. Ультраструктура тромбоцитів крові хворого на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і АГ з нормальбумінурією. Основна група. Електроннограма.  $\times 10000$ .

Навпроти, у хворих за наявності МАУ відзначалися значні патологічні зміни тромбоцитів, які супроводжувались істотною гетероморфністю тромбоцитарного пулу щодо його функціональної гіперактивності і змін структури хромомера більшості тромбоцитів на тлі їх морфологічної трансформації за гіаліновим типом.

Спостерігалися численні циркулюючі агрегати крові з наявністю значної кількості функціонально активних поліморфноядерних лейкоцитів у складі агрегатів з розвинутими псевдоподіями, численними фагосомами та їх комплексами

зі специфічними і неспецифічними гранулами.

Дослідження виявило незначний вміст лейкоцитів у складних тромбоцитарних агрегатах, причому серед них переважали нейтрофільні гранулоцити. Їх морфологія свідчила про суттєво підвищену функціональну активність: цитоплазма клітин характеризувалась гетероморфністю, клітини мали численні псевдоподії, кількість фагосом та їх комплексів зі специфічними і неспецифічними гранулами була збільшеною, виявлялися незрілі нейтрофіли (рис. 2).

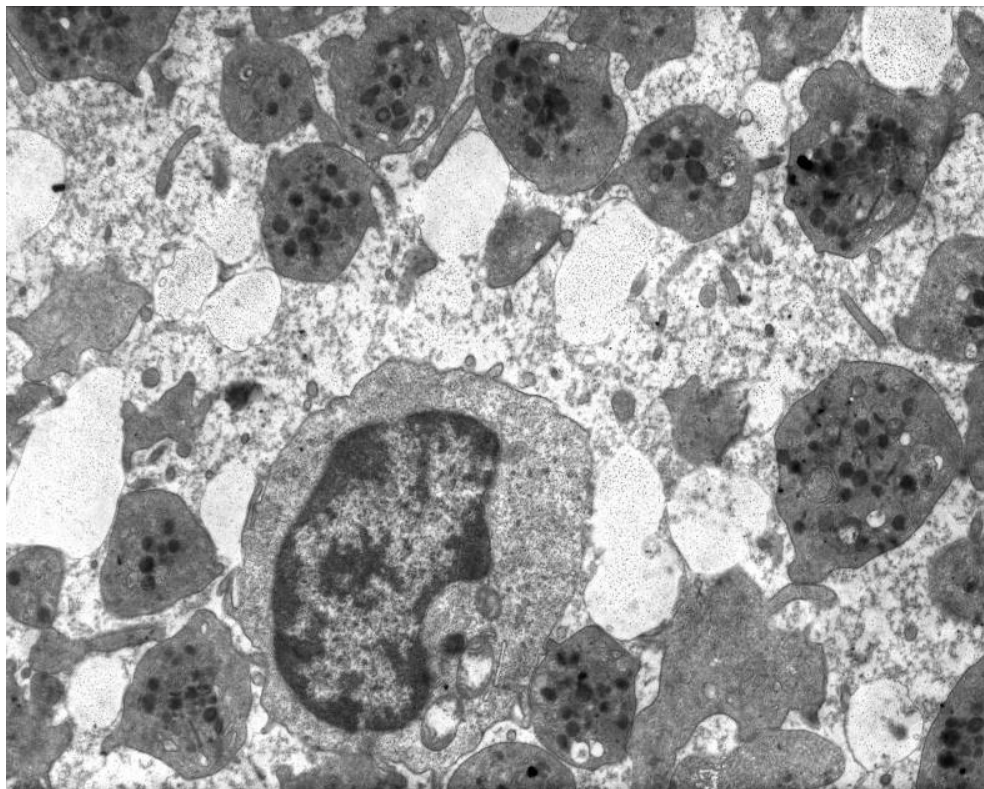


Рис. 2. Ультраструктура формених елементів крові хворої на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і АГ з МАУ. Група порівняння. Електронорама.  $\times 6000$ .

Поодинокі еозинофільні гранулоцити виявляли ознаки гіперактивації за рахунок утворення розвинутих псевдоподій, значної деформованості, певної редукції органел загального призначення. Специфічні еозинофільні гранули розташовувались з незначною щільністю, часто на периферії клітин і свідчили про їх зрілість. Отже, поряд зі змінами нейтрофілів, характерними для ендотеліальної дисфункції, ознаки гіперактивації еозинофілів вказували на розвиток значного внутрішньосудинного запалення, а їх відносно невелика кількість у складі агрегатів – на обмеження участі еозинофілів як адаптивного регулятора запалення і як агента позаклітинного фібринолізу. Крім того, на відміну від морфології циркулюючих агрегатів у пацієнтів з нормальбумінурі-

єю, складні агрегати у хворих з МАУ містили значну кількість еритроцитів, серед яких переважали незворотно трансформовані форми – куполоподібні та сфероцити, а також еритроцити у вигляді спущеного м'яча.

При ультраструктурному дослідженні дегранульованих тромбоцитів поблизу цитолемі виявлялися чисельні лабільні гранули з дефрагментованими мембранами. Такі постклітинні форми, на відміну від агрегованих тромбоцитів, переважно зустрічалися поза складом агрегатів. Також на початкових етапах дослідження спостерігалася поява великих сферичних форм з наявністю новоутворених псевдоподій на поверхні, ознаками дестабілізації зовнішньої мембрани та суттєвим розширенням відкритої каналце-

вої системи. Глибокі ділянки цієї системи містили аморфний матеріал помірної електронної щільності. Кількість щільних тілець перевищу-

вала вміст альфа-гранул, лізосоми і мітохондрії спостерігались у значно меншій кількості порівняно з інтактними тромбоцитами (рис. 3).

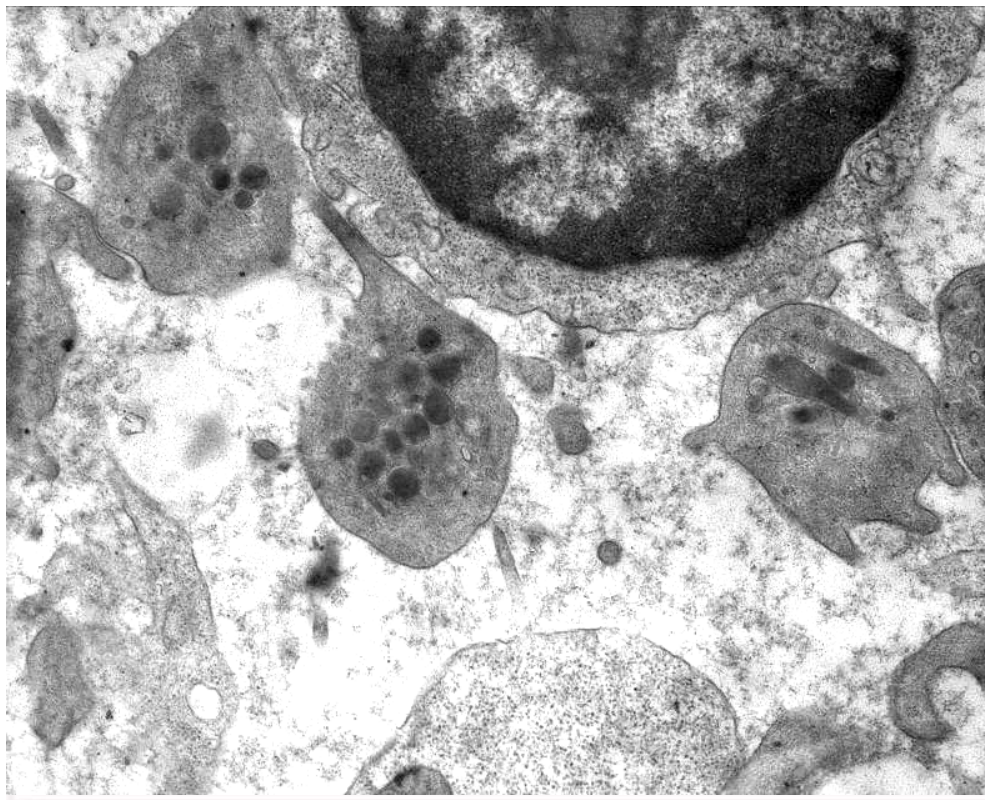


Рис. 3. Ультраструктура тромбоцитів крові хворої на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і АГ з МАУ. Основна група. Електроннограма.  $\times 10000$ .

Кореляційний аналіз виявив існування суттєвих зв'язків між вмістом активованих, дегранульованих і агрегованих тромбоцитів. Достовірно зменшена відносно контролю щільність упакування альфа-гранул (на 43,5%) зворотно і сильно корелювала з параметрами внутрішньосудинної активації тромбоцитів, а також з концентрацією тромбоцитарних агрегатів всіх розмірів. Вміст дельта-гранул за рахунок значного варіювання їх кількості в грануломері тромбоцитів не відрізнявся статистично вагомо від показників контрольної групи, проте кореляційний аналіз виявив їх достовірний зворотній зв'язок з відносною кількістю агрегованих ( $r=-0,74$ ;  $p<0,05$ ), дегранульованих ( $r=-0,70$ ;  $p<0,05$ ) і активованих тромбоцитів ( $r=-0,55$ ;  $p<0,05$ ), а також чітку пряму кореляцію з вмістом альфа- і лямбда-гранул тромбоцитів.

Показник лізосомальної активності у хворих даного контингенту (НбА1с у межах від 7% до 8%) встановлював достовірну кореляцію з параметрами внутрішньосудинної активації тромбоцитів, а також з вмістом інших типів тромбоцитарних гранул і рівнем малих циркулюючих агрегатів. Щільність упакування мітохондрій тромбоцитів вірогідно поступалася показнику конт-

рольної групи (на 41,7-45,8%), встановлюючи позитивний кореляційний зв'язок з часткою неактивованих клітин ( $r=+0,60$ ;  $p<0,05$ ), зворотний зв'язок – з вмістом дегранульованих тромбоцитів ( $r=-0,61$ ;  $p<0,05$ ), що вказувало на ушкодження енергетичного апарату клітинної ланки гемостазу.

При проведенні мікроскопії збагаченої тромбоцитами фракції крові спостерігалось статистично вагоме зниження вмісту нормальних дискподібних тромбоцитів за рахунок різкого зростання кількості дискоехіноцитів, сфероцитів і сфероехіноцитів, що призводило до дворазового підвищення вмісту активних клітин: у групі порівняння – у 2,4 рази, в основній групі – у 2,5 рази. Також у даних клінічних групах встановлено різке зростання у циркуляції малих тромбоцитарних агрегатів (у 3,6-3,7 рази) і тромбоагрегатів середніх і великих розмірів (у 13,7-14,1 рази) у порівнянні з контрольними значеннями. При цьому рівень агрегатоутворення малих гомогенних форм встановлював достовірну кореляцію з більшістю досліджуваних морфологічних параметрів тромбоцитарного гемостазу. На тлі субоптимального глікемічного контролю агрегаційна активність у напрямку утворення середніх і ве-

ликих (переважно складних) агрегатів, на відміну від групи пацієнтів з якісним глікемічним контролем, встановлювала достовірну пряму кореляцію з вмістом агрегованих ( $r=+0,49$ ) і активованих ( $r=+0,54$ ) тромбоцитів, а також зворотній зв'язок з щільністю упакування альфа-гранул ( $r=-0,61$ ;  $p<0,05$ ).

Підрахунок вмісту зворотно трансформованих еритроцитів дозволив виявити достовірне підвищення параметра в обох клінічних групах: у групі порівняння – на 34,8%, в основній групі – на 36,1%. Вміст незворотно змінених форм еритроцитів у даних хворих також суттєво перевищу-

вав контрольний рівень (табл. 2).

Виходячи із завдань дослідження, нами було проведено визначення взаємозв'язку між показниками, що характеризують стан ендотеліальної функції, функції нирок, ліпідемічного профілю у хворих на ЦД 2 типу з АГ, з даними морфологічного вивчення тромбоцитарної ланки гемостазу у даних пацієнтів (рис. 4). Розрахунок коефіцієнтів парної лінійної кореляції показав наявність достовірного зворотного зв'язку між рівнем HbA1c та вмістом неактивованих тромбоцитів ( $r=-0,53$ ) і щільністю упакування альфа-гранул ( $r=-0,73$ ).

Параметри	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	-0,53	+0,82	+0,60	+0,77	-0,73	-0,31	-0,18	+0,20	+0,76	+0,22
2	-0,28	+0,55	+0,22	+0,62	-0,51	-0,22	+0,09	-0,34	+0,64	+0,15
3	+0,07	+0,12	+0,17	+0,22	+0,14	-0,22	+0,16	-0,04	+0,20	+0,21
4	-0,69	+0,83	+0,88	+0,76	-0,72	-0,57	-0,49	+0,18	+0,69	+0,25
5	-0,63	+0,71	+0,52	+0,79	-0,57	-0,48	-0,60	+0,24	+0,51	+0,08
6	-0,76	+0,72	+0,66	+0,81	-0,63	-0,53	-0,47	-0,21	+0,79	+0,22
7	+0,16	+0,09	+0,30	+0,06	+0,23	+0,15	-0,03	+0,10	+0,08	+0,24
8	-0,53	+0,66	+0,61	+0,75	-0,15	-0,23	+0,06	-0,21	+0,56	+0,20
9	+0,21	+0,13	-0,09	-0,48	+0,18	+0,22	+0,17	+0,35	-0,51	+0,23
10	-0,14	+0,55	+0,18	-0,23	-0,12	-0,30	+0,11	-0,06	+0,61	+0,14
11	+0,23	+0,50	+0,20	+0,16	-0,12	-0,17	-0,12	+0,19	+0,20	+0,08
12	-0,54	-0,18	+0,30	+0,68	-0,70	-0,22	+0,16	-0,31	+0,17	+0,11
13	+0,26	-0,17	+0,12	+0,25	+0,24	+0,11	+0,27	+0,13	+0,20	+0,19
14	-0,51	+0,59	+0,48	+0,70	-0,55	-0,52	+0,24	+0,11	+0,16	+0,12
15	-0,56	+0,63	+0,60	+0,57	-0,53	-0,59	-0,22	+0,18	+0,30	+0,28

Рис. 4. Кореляційні зв'язки між клініко-лабораторними і морфологічними параметрами у хворих на ЦД 2 типу з субоптимальним глікемічним контролем і АГ. Перелік параметрів: 1 – HbA1c; 2 – САТ; 3 – ДАТ; 4 – ендотелін-1; 5 – фактор Вілебранда; 6 – тромбомодулін; 7 – гемоглобін; 8 – рівень альбумінурії; 9 – ШКФ; 10 – сечовина; 11 – креатинін; 12 – загальний холестерин; 13 – ЛПВЩ; 14 – ЛПНЩ; 15 – тригліцериди; 16 – неактивовані тромбоцити; 17 – агреговані тромбоцити; 18 – дегранульовані тромбоцити; 19 – активовані тромбоцити; 20 – альфа-гранули; 21 – дельта-гранули; 22 – лямбда-гранули; 23 – мітохондрії; 24 – малі тромбоцитарні агрегати; 25 – середні та великі тромбоцитарні агрегати. Жирним шрифтом наведені статистично вагомі коефіцієнти лінійної кореляції ( $p<0,05$ ).

На тлі субоптимального глікемічного контролю концентрація глікованого гемоглобіну щільно корелювала з часткою активованих тромбоцитів ( $r=+0,77$ ;  $p<0,05$ ), з рівнем агрегованих форм ( $r=+0,82$ ;  $p<0,05$ ) і концентрацією малих тромбоцитарних агрегатів крові ( $r=+0,76$ ;  $p<0,05$ ), встановлювала позитивний зв'язок з часткою дегранульованих тромбоцитів ( $r=+0,60$ ;  $p<0,05$ ).

Підвищені рівні маркерів ендотеліальної дисфункції знаходились у щільному кореляційному

зв'язку з більшістю ультраструктурних параметрів судинно-тромбоцитарного гемостазу. У хворих даного контингенту найбільша сила достовірних лінійних кореляцій спостерігалася у парах: ендотелін-1 і агреговані тромбоцити ( $r=+0,83$ ), ендотелін-1 і дегранульовані тромбоцити ( $r=+0,88$ ), фактор Вілебранда і активовані тромбоцити ( $r=+0,79$ ), тромбомодулін і активовані тромбоцити ( $r=+0,81$ ), тромбомодулін і малі тромбоцитарні агрегати ( $r=+0,79$ ).

Показники, що відображають стан функції



нирок, встановлювали таку структуру кореляційних зв'язків з морфологічними параметрами тромбоцитів: відзначалася пряма кореляція рівня альбумінурії з часткою активованих ( $r=+0,75$ ;  $p<0,05$ ) і агрегованих тромбоцитів ( $r=+0,66$ ;  $p<0,05$ ), а також вмістом малих тромбоцитарних агрегатів ( $r=+0,56$ ;  $p<0,05$ ). Встановлювалась помірна за силою зворотна кореляція з вмістом неактивованих форм ( $r=+0,53$ ;  $p<0,05$ ) і прямий зв'язок з концентрацією дегранульованих клітин ( $r=+0,61$ ;  $p<0,05$ ). Концентрації сечовини і креатиніну, а також показники ШКФ слабо корелювали з більшістю морфологічних критеріїв порушення тромбоцитарної ланки гемостазу, за виключенням вмісту малих тромбоцитарних агрегатів крові.

Ознаки атерогенної триади дисліпідемії, які у хворих даного контингенту вказували на суттєві відхилення від показників групи контролю, не лише мали кореляційний зв'язок з часткою активованих тромбоцитів і вмістом їх альфа- і дельта-гранул, а й утворювали нові помірної сили кореляції з іншими досліджуваними параметрами морфології тромбоцитів. Зокрема, формувалися достовірні значення коефіцієнтів лінійної кореляції у парax: загальний холестерин і неактивовані тромбоцити ( $r=-0,54$ ), холестерин ЛПНЩ і неактивовані тромбоцити ( $r=-0,51$ ), холестерин ЛПНЩ і агреговані форми ( $r=+0,59$ ), холестерин ЛПНЩ і дегранульовані тромбоцити ( $r=+0,48$ ). Також рівень гіпергліцеридемії у даних хворих встановлював статистично вагомі кореляційні зв'язки з усіма дослідженими параметрами внутрішньосудинної активації тромбоцитів.

## Висновки

1. Поглиблення ендотеліальної дисфункції у хворих з субоптимальним глікемічним контролем і артеріальною гіпертензією щільно корелює із ступенем нефропатичних і дисліпідемічних порушень. У даних пацієнтів відбувається достовірне зростання рівня альбумінурії, зменшення швидкості клубочкової фільтрації, підвищення концентрації сечовини та креатиніну.

2. У хворих з субоптимальним глікемічним контролем порушення тромбоцитарного гемостазу виявляються у достовірному збільшенні відносного вмісту активованих тромбоцитів на 126,9-135,9% з підвищенням вмісту агрегованих і дегранульованих форм та появою численних тромбоцитів з дисбалансом альфа- і дельта-гранул, а також редукцією мітохондрій тромбоцитів.

3. З мірою зростання рівня глікованого гемоглобіну на тлі значного посилення зв'язків між показниками ендотеліальної дисфункції й ушкодженої тромбоцитарної ланки гемостазу (до  $r=+0,95$ ) утворюються достовірні кореляції ультраструктурних характеристик тромбоцитів з клініко-лабораторними ознаками нефропатичних і дисліпідемічних змін.

**Перспективи подальших досліджень** пов'язані з вивченням впливу тривалої цукрознижувальної та антигіпертензивної терапії на структуру взаємозв'язків між клініко-лабораторними і морфологічними параметрами ендотеліальної дисфункції та тромбоцитарного гемостазу у хворих на ЦД і АГ.

## Літературні джерела References

1. Dedov II, Shestakova MV, editors. [Diabetes: acute and chronic complications]. Moscow: Publishing house "Medical Information Agency"; 2011. 480 p. Russian.
2. Epstein M. Diabetes and hypertension: the bad companions. *Hypertension*. 1997;15(2):55-62.
3. Torimoto K, Okada Y, Mori H, Tanaka Y. Relationship between fluctuations in glucose levels measured by continuous glucose monitoring and vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;13:18-24.
4. Xu J, Zou MN. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2009;119:1266-86.
5. Demirtunc R, Duman D, Basar M. The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2009;23(2):89-94.
6. Lusher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*. 1997;10(11):3-10.
7. Ametov AS. [Type 2 diabetes mellitus. Problems and Solutions]. Moscow: GEOTAR-Media; 2012. 704 p. Russian.
8. Mathewkutty S, McGuire DK. Platelet perturbations in diabetes: implications for cardiovascular disease risk and treatment. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2009;7(5):541-9.
9. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Rad Biol Med*. 2003;34(12):1563-74.
10. Heude B. Cognitive decline and fatty acid composition of erythrocyte membranes. *Amer J Clin Nutrition*. 2003;77(4):803-8.
11. Vitkovskiy YuA, Kuznik BI, Solpov AV. [Pathogenetic significance of lymphocyte-platelet adhesion]. *Medical immunology*. 2006;5:745-52. Russian.
12. Alekseev VV, Karpishchenko AI. [Medical laboratory technology. Manual of Clinical Laboratory Diagnostics]. Moscow: GEOTAR-Media; 2012.

472 p. Russian.

13. Sawatzke CL, Solomons CC. Fixation and embedding of small volumes of platelets for transmission electron microscopy. *J Clin Pathol.* 1980;33(6):600-2.

14. Mironov AA, Komissarchik YuYa, Mironov VA. *Metodyi elektronnoy mikroskopii v biologii i meditsine: Metodicheskoe rukovodstvo.* [Electron microscopy methods in biology and medicine : Methodological Guide]. St. Petersburg: Science;

1994. 400 p. Russian.

15. Medvedev IV, Kumova TA. Oslablenie agregatsionnoy sposobnosti trombocitov u bolnyih arterialnoy gipertoniey pri metabolicheskom sindrome na fone losartana. [Weakening aggregability platelets in hypertensive patients with metabolic syndrome on a background of losartan]. *Russ J Cardiol.* 2008;5:53-5. Russian.

16. Lakin GF. [Biometrics]. 4th ed rev and enl. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. 352 p. Russian.

**Перцева Н.О. Взаимосвязь морфологических изменений форменных элементов крови с эндотелиальной функцией, функцией почек и липидемическим профилем у больных сахарным диабетом 2 типа с субоптимальным гликемическим контролем и артериальной гипертензией.**

**Реферат.** Требуют выяснения и дальнейшей разработки многочисленные вопросы о связях между эндотелиальной дисфункцией и морфологическим субстратом повреждения гемостаза, которые наблюдаются при развитии сахарного диабета 2 типа в сочетании с артериальной гипертензией. У 87 больных данного контингента с субоптимальным контролем гликемии с помощью клинико-лабораторных, морфологических методов и корреляционного анализа были определены связи между эндотелиальной дисфункцией, степенью повреждения функции почек, липидемическим профилем и морфологическими изменениями сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Установлено, что на фоне значительного усиления связей между показателями эндотелиальной дисфункции и поврежденного тромбоцитарного звена гемостаза формируются достоверные корреляции ультраструктурных характеристик тромбоцитов с клинико-лабораторными признаками нефропатических и дислипидемических изменений.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа, артериальная гипертензия, эндотелиальная дисфункция, тромбоцитарный гемостаз, взаимосвязь.