

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

ЕРИТРОЦИТАРНІ ІНДЕКСИ ТА ВМІСТ ЛІГАНДНИХ ФОРМ
ГЕМОГЛОБІНУ В КРОВІ ЩУРІВ ІЗ ТОКСИЧНИМ
УРАЖЕННЯМ ПІСЛЯ ЧАСТКОВОЇ ГЕПАТЕКТОМІЇ

Кваліфікаційна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконав:
студент 6 курсу, 600 М групи
Місюра Степан Віталійович
Керівник:
д.б.н., професор **Копильчук Г.П.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2024 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2024

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню еритроцитарних індексів та вмісту лігандних форм гемоглобіну в крові щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном після часткової гепатектомії.

Встановлено, що після часткової резекції тканин печінки у щурів із токсичним ураженням зниження концентрації гемоглобіну та зменшення кількості еритроцитів відбувається впродовж усього регенеративного періоду із поглибленням стану анемії та еритропенії у фазу термінації (72 год) та віддалений період (168 год).

Відновлення тканин печінки після часткової гепатектомії у контрольних щурів характеризується незначною нормохромією внаслідок зниження середнього вмісту та концентрації гемоглобіну в еритроцитах на ранніх етапах регенерації з віддаленим ефектом макроцитозу. Часткова резекція печінки у тварин із токсичним ураженням супроводжується розвитком гіпохромної мікроцитарної анемії із посиленням на термінальних стадіях (72 та 168 год) регенераційного процесу.

У крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відбувається підвищення рівня карбоксигемоглобіну з максимальними значеннями на віддалених етапах регенерації печінки (72 та 168 год), що робить можливим використання даного показника як біомаркера розвитку гемічної гіпоксії після операційних утручань, викликаних гострою гепатотоксичністю. Максимально підвищений рівень метгемоглобіну на тлі зниження активності НАДН-метгемоглобінредуктази на ранніх етапах регенерації (24 та 48 год) печінки може бути корисним для надання унікальної інформації про ступінь гіпоксії тканин, спричиненої анемією, у тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном.

Ключові слова: гемоглобін, еритроцити, карбоксигемоглобін, метгемоглобін, метгемоглобінредуктаза, ацетамінофен, часткова гепатектомія, регенерація

ABSTRACT

This master's thesis aims to investigate erythrocyte indices and the content of ligand forms of hemoglobin in the blood of rats with acetaminophen-induced toxic liver injury after partial hepatectomy.

It was established that after partial resection of liver tissues in rats with toxic injury, a decrease of hemoglobin concentration and red blood cell count throughout the entire regenerative period, with a deepening of anemia and erythropenia in the termination phase (72 hours) and the long-term period (168 hours).

Partial liver resection in animals with toxic injury was accompanied by the development of hypochromic microcytic anemia with an intensification at the terminal stages (72 and 168 hours) of the regenerative process.

Carboxyhemoglobin level in the blood of rats with toxic injury after partial hepatectomy increased, with the highest values in the distant periods of liver regeneration (72 and 168 hours). The maximally elevated level of methemoglobin against the background of a reduced NADH-methemoglobin reductase activity in the early stages of liver regeneration (24 and 48 hours) may be useful for providing unique information about the degree of tissue hypoxia caused by anemia in animals with acetaminophen toxic injury.

Key words: *hemoglobin, erythrocytes, carboxyhemoglobin, methemoglobin, methemoglobin reductase, acetaminophen, partial hepatectomy, regeneration*

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

С.В. Місюра
(підпис)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Модель регенерації печінки після часткової гепатектомії.....	7
1.2. Біохімічні особливості регенерації печінки після ушкодження ацетамінофеном.....	11
1.3. Гемоглобін, його форми та функції.....	14
1.4. Гематологічні показники в лабораторній діагностиці.....	18
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1. Об'єкт та методи досліджень.....	22
2.2. Відбір крові та отримання дослідного матеріалу.....	23
2.3. Визначення гематологічних показників.....	23
2.4. Визначення вмісту загального гемоглобіну.....	24
2.5. Визначення вмісту карбоксигемоглобіну.....	25
2.6. Визначення вмісту метгемоглобіну.....	26
2.7. Визначення активності метгемоглобінредуктази.....	26
2.8. Статистична обробка результатів.....	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	28
ВИСНОВКИ.....	50
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	51
ДОДАТКИ.....	58

ВСТУП

Печінка є унікальним органом, що володіє високою регенеративною здатністю. Тому можна безпечно виконувати часткову гепатектомію (ЧГ) або часткову трансплантацію печінки (ЧТП). Регенерація печінки включає складну мережу численних гепатотропних факторів, цитокінів, шляхів і факторів транскрипції. Порівняно з регенерацією печінки після вірусного або медикаментозного ураження печінки, регенерація після ЧГ або ЧТП має декілька відмінних особливостей, таких як гемодинамічні зміни портального венозного потоку або тиску, тканинна ішемія/гіпоксія та гемостаз/активація тромбоцитів [1].

Експериментальні моделі, які включають часткову гепатектомію або хімічне ушкодження, виявили позаклітинні та внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які використовуються для повернення печінки до еквівалентного розміру та ваги до тих, що були до ушкодження. З іншого боку, хронічна втрата гепатоцитів, яка може виникнути при хронічному захворюванні печінки будь-якої етіології, часто має несприятливі наслідки, включаючи фіброз, цироз та неоплазію печінки. Регенеративна діяльність гепатоцитів і холангіоцитів зазвичай характеризується фенотиповою точністю. Однак, коли регенерація одного з двох типів клітин не вдається, гепатоцити та холангіоцити функціонують як факультативні стовбурові клітини та трансдиференціюються одна в одну для відновлення нормальної структури печінки. Моделі реколонізації печінки продемонстрували, що гепатоцити мають необмежену регенеративну здатність [2].

Резекції печінки традиційно асоціюються зі значною смертністю, особливо пов'язаною з інтраопераційною крововтратою. Анемія є однією з найпоширеніших проблем, і до клінічної та лабораторної оцінки необхідно підходити логічно. Загальний аналіз крові з індексами еритроцитів дає ключ до діагностики функціонального стану печінки за умов гострого чи хронічного ураження (медикаментозними, промисловими ксенобіотиками, вірусами тощо) та моніторингу після операційних втручань. Багато анемії мають

характерну морфологію еритроцитів. Кількість ретикулоцитів служить корисним скринінговим тестом для гемолізу або втрати крові [3].

Гематологічні показники є одними із найчастіших лабораторних тестів, оскільки дозволяють оцінити функціональний стан організму, провести диференційну діагностику захворювань, важкості їх перебігу, спрогнозувати перебіг патологічного процесу [4].

Особливе значення належить оцінці кількості еритроцитів (RBC), їх середнього об'єму (MCV), ширини розподілу еритроцитів (RDW), концентрації гемоглобіну (HGB), його середнього вмісту в еритроциті (MCH) та середньої концентрації в еритроциті (MCHC) [5.]

Мета роботи – дослідження еритроцитарних індексів, концентрації загального гемоглобіну та його лігандних форм – метгемоглобіну й карбоксигемоглобіну в крові щурів із гострим токсичним ураженням після часткової гепатектомії.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Модель регенерації печінки після часткової гепатектомії

Унікальною властивістю печінки, що відрізняє її від інших органів є здатність до самовідновлення після цирозу, гепатотоксичних пошкоджень та втрати клітин. Цю виняткову регенеративну властивість печінки найбільш чітко демонструє експериментальна модель часткової гепатектомії (ЧГ) на 2/3 у щурів, яку вперше запровадили Хіггінс і Андерсон у 1931 році. У цій моделі хірургічним шляхом видаляється 70% печінки дослідним тварин. Залишкові частки печінки відновлюють початкову масу печінки протягом приблизно тижня після операції, хоча резецовані частки ніколи не відростають знову [6].

Результатом видалення двох третин печінки, а також меншого її об'єму, є проліферація та гіпертрофія гепатоцитів. Після видалення двох третин органу, більша частина маси печінки відновлюється протягом 7-8 днів, з повним відновленням протягом 3 тижнів. Залишкові частки збільшуються у розмірі та в своїй сукупності печінка досягає такої ж маси, як до початку оперативного втручання. Заново сформований орган немає нових лопастей або частин. Після регенерації частини печінки, жовчні протоки збільшуються у розмірах. Ширина пластинок гепатоцитів збільшується від одного гепатоцита до, в середньому, 1,5 гепатоцитів, котрі оточені з обох боків печінковими синусоїдами. Це стосується також холангіоцитів, печінкових зірчастих клітин, синусоїдних ендотеліальних клітини, клітин Купфера а також інших типів клітин [7].

Модель регенерації печінки після часткової гепатектомії у щурів має перевагу в будові печінки. Орган складається з декількох частин, що дозволяє хірургічне видалення окремих частин печінки, не викликаючи некрозу в її інших частинах. Ця особливість дозволяє вивчати суто регенеративну здатність печінки. Часткова гепатектомія також дозволяє визначити час регенерації печінки [8].

Регенеративний процес складається з трьох етапів. Першим із них є фаза праймінгу, що характеризується переходом гепатоцитів з G0 до G1 фази

клітинного циклу внаслідок стимуляції. Прикладом даної стимуляції є запалення, що характеризується рекрутуванням, проліферацією та активацією ряду запальних клітин та імунних клітин, і вона спрямована на полегшення інфекцій, усунення пошкоджених клітин та ініціювання відновлення та регенерації тканин. Запалення проходить через весь процес пошкодження печінки і сприяє регенерації пошкодженої печінки. Індукована запаленням регенерація в основному запускається цитокінами та факторами росту, що вивільняються з клітин запалення [9].

Клітини Купфера виробляють групу цитокінів та імуномодуючих медіаторів, які мають стимулюючий та інгібуючий вплив на ураження печінки. Печінкові макрофаги є основним джерелом таких цитокінів, як фактор некрозу пухлин (TNF- α), та інтерлейкін 6 (IL-6). Їхня продукція відбувається через сигнальний шлях, що запускається передачею сигналів ліпополісахариду кишкового походження до Toll-подібного рецептора (TLR4) або C3a і C5a, компонентів системи комплементу. Вони готують гепатоцити для повторного входу в клітинний цикл на першому етапі. Втрата TNF- α , або IL-6 може затримати регенерацію печінки [10].

TLR4 розпізнає ліпополісахарид (LPS), а потім зв'язує та активує мієлоїдний фактор диференціювання 88 (MyD88), запускаючи трансдукцію сигналу, щоб сприяти вивільненню прозапальних факторів. З точки зору C3 і C5, частини вродженої імунної відповіді, яка працює в процесі пошкодження печінки для боротьби з кількома патогенами, вони впливають на проліферацію гепатоцитів шляхом активації біоактивних пептидів C3a і C5a зі стимуляцією ліпополісахариду [11].

Під час фази активної проліферації клітини печінки в фазі G1 зазнають мітотичного поділу під впливом факторів росту. У даній фазі беруть участь основні та допоміжні фактори росту. Основні фактори росту мають вагомую роль у відновленні печінки. Фактор росту гепатоцитів і ліганди рецептора, включаючи епідермальний фактор росту, трансформуючий (TGF- α) і гепарин-зв'язуючий фактор росту (HB-EGF), діючи як основні цитокіни для

гепатоцитів, можуть провокувати проліферацію гепатоцитів головним чином через сигнальний шлях через зв'язування з відповідними рецепторами. Допоміжні фактори росту, такі як жовчні кислоти (ЖК), норадреналін (НЕ), ендотеліальний фактор росту (VEGF) і серотонін затримують регенерацію печінки за їх відсутності [9].

Екзосомы є одними з факторів, що покращують процес регенерації. Екзосомы – володіють різноманітними фізіологічними властивостями та беруть участь у міжклітинних зв'язках. Екзосомы несуть активні сигнали до клітини-мішені в суміжних і віддалених областях. Вони покращують регенерацію печінки завдяки виробленню внутрішньоклітинного сфінгозин-1-фосфату (S1P). Даний сфінголіпід є незамінним для проліферації, індукованої екзосомами гепатоцитів. Також відомо, що кількість екзосом збільшилася після пошкодження печінки. Подібним чином екзосомы виявляють гепатопротекторну дію та полегшують індуковане лікарськими засобами пошкодження печінки шляхом активації проліферативних і регенеративних відповідей, підкреслюючи величезний потенціал терапії захворювань печінки на основі екзосом [12].

Віддалений період після проведення гепатектомії характеризується нормалізацією співвідношення маси печінки відносно маси тіла. Коли печінка досягає 2,5% від маси тіла регенерація припиняється. За припинення проліферації печінки відповідає бета-трансформуючий фактор росту (TGF- β). TGF- β , особливо TGF- β 1, гальмує регенерацію печінки та працює як індуктор клітинного апоптозу, будучи активним у фазі G1 клітинного циклу [9].

Регенерація після часткової резекції печінки має кілька відмінних особливостей, таких як гемодинамічні зміни портального венозного потоку або тиску, тканинна гіпоксія та активація тромбоцитів. Хоча деякі з цих змін також відбуваються при регенерації печінки після вірусного або медикаментозного ураження печінки, вони більш різкі та характерні після ЧГ. Таким чином, вони можуть бути основними причинами регенерації печінки [13].

Одним із наслідків часткової гепатектомії є проходження всього потоку ворітної вени печінки через одну третину її початкової ширини, що збільшує тиск у ворітній вені і створює напругу на синусоїдальних ендотеліальних клітинах печінки. Посилений кровотік у ворітній вені забезпечує ініціювання сигналів для регенерації печінки. В наслідок цього ендотеліальні клітини виробляють сигнальні білки. Портальна венозна кров переносить багато сигнальних молекул, включаючи епідермальний фактор росту, жовчні кислоти, інсулін та глюкагон з кишечника, селезінки та підшлункової залози. У відповідь на підвищену напругу зсуву синусоїдальні ендотеліальні клітини вивільняють оксид азоту (NO), який посилює чутливість гепатоцитів до печінкового фактора росту [14].

Інгібування індукцибельної (iNOS) або ендотеліальної NO-синтази (eNOS) серйозно пригнічує регенерацію печінки після ЧГ. Дані ферменти беруть участь в захисті від опосередкованого цитокінами пошкодження гепатоцитів, проліферації гепатоцитів та непрямим епідермальним фактором росту (EGF). NO впливає на регенерацію печінки шляхом підвищення проліферації клітин, індукції васкулярного ендотеліального фактору росту, який сприяє ангиогенезу, сприяючи регенерації печінки та стимуляції зірчастих клітин печінки [15].

Гіпоксія печінки виникає в результаті простого припинення кровотоку в печінці або зниження артеріального кровотоку через портальну гіпертензію решти печінки після ЧГ. Гіпоксія є одним із найсильніших індукторів ангиогенезу, що регулюється фактором-1 α , індукований гіпоксією (HIF-1 α). Вироблення HIF-1 α пригнічується за нормальних умов. Коли тканина зазнає ішемії, HIF-1 α активується і реагує на гіпоксію, згодом посилюючи, еритропоетин і гліколітичні ферменти, що дозволяють адаптуватися до умов гіпоксії [16].

1.2. Біохімічні особливості регенерації печінки після ушкодження ацетамінофеном

Ацетоамінофен легко переноситься в терапевтичних дозах з мінімальними побічними ефектами. Однак передозування ацетомінофеном може спричинити серйозне пошкодження печінки, яке прогресує до гострої печінкової недостатності (ГПН) і смерті. Токсичність, спричинена передозуванням даного ксенобіотика, може виникнути як наслідок гострого передозування або повторного/поступового дозування протягом короткого періоду часу [17].

При перевищенні терапевтичних доз ацетомінофену шляхи глюкуронізації та сульфатації стають насиченими, так що окислювальний шлях цитохрому P450 збільшується, збільшуючи виробництво N-ацетил-п-безохінононіміну (NAPQI), який не може бути повністю нейтралізований глутатіоном (GSH), виникнення оксидативного стресу та мітохондріальної дисфункції призводить до виснаження АТФ, що в кінцевому підсумку викликає гепатоцелюлярний некроз і загибель клітини [18].

Процес гепатотоксичної дії включає в себе утворення пероксинітриду (ONOO^-) внаслідок реакції супероксиду (O_2^-) та NO . Активні форми кисню, а також ONOO^- нейтралізується глутатіоном, який знижується під час дії ацетомінофену, посилюючи таким чином окисне пошкодження. Активні форми кисню (АФК), а також активні форми азоту призводять до дисфункції мітохондріальної мембрани шляхом руйнування її пор та набухання органел, що призводить до клітинного некрозу. Під час нетоксичної дії ацетомінофену, NAPQI швидко кон'югує з печінковим глутатіоном та утворює нетоксичні меркаптатні та цистеїнові сполуки, які є виводиться з сечею. Основний шлях метаболізму здійснюється шляхом глюкуронізації або сульфатації. В разі переповнення шляху при гепатотоксичних дозах ацетомінофену, більшість ацетомінофену метаболізується за допомогою CYP2E1 до NAPQI, що призводить до виснаження GSH [19].

Ацетомінофен швидко всмоктується з кишечника та транспортується до печінки, де він головним чином кон'югується з глюкуроною кислотою ферментами підродина UDP-глюкуронозилтрансфераз (UGT) або сульфатується ферментами сульфотрансферазами в терапевтичних дозах з подальшим виведенням із сечею [20].

Ознаками некрозу, спричиненого ацетомінофеном є набряк клітин і органел, вивільнення клітинного вмісту та запалення. Крім того, під час гепатотоксичності не спостерігається відповідної активації каспаз. Таким чином, апоптоз кількісно не є відповідним способом загибелі клітин під час ацетомінофен-індукованого пошкодження [18].

Модель печінкової недостатності на тлі ураження ацетамінофеном дозволяють в повній мірі дослідити процес регенерації печінки. Відомо, що печінка є основним метаболічним органом, пов'язаним з виробленням циркуляторних апоптичних везикул, у якому вони піддаються ендоцитозу гепатоцитами через систему розпізнавання глюкози. Крім того, апоптичні везикули відіграють незамінну роль у попередженні виникнення гепатоцелюлярних пошкоджень та порушень функції печінки. Вони утворюють комплекс органел з гепатоцитарним апаратом Гольджі за допомогою механізму рецептора білка розчинного N-етилmaleїміду, що є чутливим до фактора приєднання, який зберігає цілісність Гольджі, сприяє ацетилюванню мікротрубочок шляхом регуляції α -тубулін N-ацетилтрансферази 1 і, в результаті, полегшує цитокінез гепатоцитів для відновлення печінки. Збірка комплексу з апоптичних везикул та апарату Гольджі сприяє гомеостазу печінки, регенерації та захисту від гострої печінкової недостатності [21].

Процеси загибелі клітин і запалення тканин частіше спостерігаються при гострому та хронічному ураженні печінки, ніж як наслідок гепатектомії. Макрофаги/моноцити відіграють важливу роль у пошкодженні та відновленні печінки. Вони виробляють про- та протизапальні медіатори, які можуть

запускати шляхи загибелі клітин гепатоцитів, а також активувати захисні сигнальні шляхи [22].

Макрофаги залучаються до некротичної ділянки після передозування ацетомінофеном і відіграють важливу роль у видаленні залишків і відновленні тканин. Залучення макрофагів опосередковується моноцитарним хемоаттрактантним білком, в наслідок чого продукція білків збільшується в некротичних областях після передозування ацетомінофеном. Макрофаги можуть відігравати важливу та дуже ранню роль у проліферації гепатоцитів після ацетомінофен-індукованого пошкодження печінки, виходячи з фактів, що макрофаги, як відомо, виробляють мітогени, такі як HGF, TGF- α , тромбоцитарні похідний фактор росту, TNF- α та IL-6, і що проліферація відбувається спочатку після токсичності APAP у шарі гепатоцитів, що оточує некротичні зони, де макрофаги активно інфільтрують і проліферують [23].

У печінці після гострого пошкодження наявні резидентні макрофаги, до яких відносяться клітини Купфера та інфільтровані макрофаги. Внаслідок ураження ацетамінофеном клітини печінки задіюють циркулюючі моноцити, які в свою чергу є залежними від рецептора хемокінів CC типу 2. За відсутності інфільтруючих макрофагів у рецепторах виникає затримка у відновленні тканин після ацетамінофен-індукованого ураження печінки. Однак, клітини Купфера можуть компенсувати відсутність інфільтруючих макрофагів [24].

Фактор росту ендотелію судин відіграє важливу роль у відновленні кровоносних судин під час регенерації печінки після часткової гепатектомії. Стимульовані факторами росту ендотеліальні клітини продукують фактори росту гепатоцитів та беруть безпосередню участь у проліферації гепатоцитів. Їхній рівень у печінці підвищується після передозування ацетамінофеном, що в свою чергу посилює регенерацію гепатоцитів, в неадекватності від зміни початкової гепатотоксичності [23].

1.3. Гемоглобін, його форми та функції

Молекула гемоглобіну складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів глобіну. Кожен з них містить гемовий фрагмент з протопорфіриновим кільцем, що складається з чотирьох пірольних кілець і центрального іону заліза у двовалентному стані (Fe^{2+}). Молекули гемоглобіну (HbA) мають молекулярну масу 64 458 Да зі складною четвертинною структурою [25].

Гем синтезується в цитозолі та мітохондріях еритроцитів. Основною його складовою є протопорфірин, що синтезується шляхом конденсації гліцину та сукцинілового коферменту, в результаті чого утворюються лінійні молекули тетрапіролу. В кінцевому результаті дані молекули циклізуються в протопорфіринове кільце. Утворений комплекс зв'язується з іонами заліза та утворює гем [26].

Більша частина гемоглобіну знаходиться у формі HbA та складається з двох α - та двох β -глобінових ланцюгів, що синтезуються в цитозолі еритроцитів. Кожен α -ланцюг містить 141 амінокислоту, а кожен β -ланцюг – 146. Менша його частина – форма HbA₂ погано переносить кисень. Фетальний гемоглобін (HbF) складається з двох α -ланцюгів і двох γ -ланцюгів. Даний тип гемоглобіну найбільш активний в ранньому віці, для полегшення перенесення кисню. Однак з часом його кількість зменшується, оскільки синтезується більше HbA [27].

Основними функціями гемоглобіну є транспорт кисню (O_2) шляхом його зв'язування у легенях та перенесення до тканин організму та виведення вуглекислого газу (CO_2). Кисень оборотно зв'язується з гемом. Кожна молекула гемоглобіну може переносити до чотирьох молекул кисню. Зв'язування кисню з однією групою гему збільшує спорідненість до кисню в інших групах гему. Цей зв'язок між компонентами гемоглобіну означає, що оксигемоглобін має суттєво відмінну четвертинну структуру від дезоксигемоглобіну. Коли молекула кисню зв'язується з гемом, вона підтягує іон заліза ближче до площини протопорфіринового кільця, злегка сплюсшуючи кільце і таким чином змінюючи його форму. Цей невеликий рух у центрі ланцюга глобіну

передається на поверхню молекули. Іонні взаємодії, що утримують ланцюги глобіну разом тимчасово не функціонують і, коли вони знову формуються в іншому положенні, четвертинна структура змінюється, що збільшує спорідненість зв'язування кисню іншими ланцюгами глобіну [28].

Спорідненість гемоглобіну до кисню є найнижчою, коли перша молекула кисню зв'язується з молекулою дезоксигемоглобіну. Кожна наступна молекула кисню легше зв'язується з гемоглобіном, тому градієнт кривої збільшується. У міру подальшого збільшення парціального тиску кисню майже всі місця зв'язування кисню стають зайнятими, тому крива знову вирівнюється. За нормальних фізіологічних умов, коли насичення венозного тиску становить 75% або вище, лише кінцева молекула кисню зв'язується та від'єднується від гемоглобіну, що робить цю систему високоефективною [29].

Субодиниці гемоглобіну зв'язують кисень та інші ліганди через гемове залізо, яке знаходиться в гідрофобній кишені, яка звернена назовні від тетрамерів гемоглобіну А. Гемове залізо зв'язується з білками глобіну та «проксимальним» гістидином. Кілька додаткових амінокислот у білках глобіну стабілізують зв'язування гема через нековалентні взаємодії. Залізо має бути у відновленому (залізистому, Fe^{2+}) стані, щоб гемоглобін зв'язував кисень. Окислений гемоглобін не може зв'язувати кисень та має тенденцію до втрати геміну та денатурації [30].

Карбоксигемоглобін (COHb) – це похідна гемоглобіну, що зв'язується з оксидом вуглецю, який володіє спорідненістю, вищою в 210 разів порівняно із киснем. Токсична дія речовини полягає у конкуренції з киснем за сайт зв'язування двохвалентного заліза. Продукція карбоксигемоглобіну в організмі відбувається внаслідок вдихання вуглецю, що потрапляє в альвеоли легень, після чого проникає альвеолярно-капілярну мембрану та зв'язується із гемоглобіном. [26].

Також карбоксигемоглобін утворюється природним шляхом під дією гемоксигеназ у результаті розпаду гемоглобіну. Для утворення цієї стійкої сполуки необхідний оксид вуглецю (CO), який виступає вторинним продуктом

окислення атому карбону з утворенням кінцевого продукту реакції монооксиду вуглецю замість кінцевої молекули вуглекислого газу. Вуглекислий газ зв'язується з гемовими білками, змінюючи їх функцію. Відомо, що інтоксикація, спричинена СО, зазвичай пов'язана з недостатньою системною доставкою кисню, тоді як цитотоксичність здебільшого пов'язана зі зв'язуванням оксиду вуглецю з цитохром-с-оксидазою, яка, у свою чергу, пригнічує мітохондріальне дихання, що призводить до дефіциту АТФ і окисного стресу [31].

Швидкість дисоціації чадного газу від гемоглобіну прямопропорційно залежить від кількості молекул кисню, що проявляється у пришвидченні процесу при збільшенні концентрації кисню в крові. За наявності карбоксигемоглобіну відбувається зміна дисоціації оксигемоглобіну, що призводить до зниження доступності кисень зв'язуючих ділянок та підвищення спорідненості кисню до інших ділянок зв'язування, що призводить до появи тканинної гіпоксії [26].

Гіпоксія виникає внаслідок недостатнього надходження кисню до тканин через недостатнє кровопостачання або низький вміст кисню в крові. До причин гіпоксії належать низький приплив крові до тканини або низький вміст кисню в крові (гіпоксемія). Гіпоксемію слід визначати як причину гіпоксії. Кисень транспортується гемоглобіном в еритроцитах, а ефективна вентиляція залежить від прямого контакту між еритроцитами та альвеолами, що сприяє дифузії [32].

Метгемоглобін (MetHb) утворюється шляхом оборотного окислення двовалентного заліза (Fe^{+2}) групи гема до тривалентного (Fe^{+3}) заліза. Оскільки тривалентне залізо не здатне зв'язувати кисень, метгемоглобін негативно впливає на транспорт кисню. За нормальних фізіологічних умов невелика кількість метгемоглобіну утворюється під час оксигенації та деоксигенації гемоглобіну. Накопиченню метгемоглобіну запобігають відновлюючі ферменти, до яких належать глутатіонредуктаза, каталаза та NADH-метгемоглобінредуктаза. Його кількість не перевищує 1%

від загального гемоглобіну. Якщо рівень метгемоглобіну підвищується, виникає метгемоглобінемія. Рівень метгемоглобіну вище 30% викликає ціаноз, що характеризується зміною кольору шкіри на синювато-фіолетовий та виникненням симптомів гіпоксії, таких як запаморочення та головний біль, тоді як підвищення рівня вище 50% може спричинити кому та смерть [33].

Метгемоглобінемія поділяється на дві форми. Набута, яку також називають токсичною метгемоглобінемією та вроджена метгемоглобінемія, яка є спадковою. Набута форма виникає в результаті впливу ксенобіотиків, таких як хімічні речовини або ліки. Ксенобіотики потрапляючи в організм через ковтання, вдихання або поглинання через шкіру чи слизові оболонки, мають прямий окислювальний ефект на гемоглобін та його метаболічні продукти. Дані речовини викликають підвищення рівня метгемоглобіну шляхом пригнічення механізмів відновлення гемоглобіну, наслідком чого є розвиток ціанозу та гіпоксії. Вроджена метгемоглобінемія найчастіше обумовлена спадковими порушеннями структури гемоглобіну або дефіцитом цитохром b₅ редуктази. Спадковими аномаліями структури гемоглобіну, що призводять до метгемоглобінемії є порушення гемоглобіну М, що є наслідком зміни амінокислоти в структурі гемоглобіну. [34].

Оскільки гемоглобін набуває характерного кольору з групи гему, зміни, які впливають на середовище гемового заліза, включаючи зміни в навколишніх амінокислотах, різних газових лігандах або окислювально-відновному стані, викликають характерні зміни в поглинанні видимого світла. Ці зміни кольору використовуються клінічно для оцінки насичення гемоглобіну киснем та утворення метгемоглобіну [33].

Через те, що метгемоглобін не може зв'язувати та транспортувати кисень, важливо, щоб еритроцити могли відновлювати метгемоглобін назад до функціонального гемоглобіну. Це відбувається в основному за допомогою NADH-залежної метгемоглобінредуктази, яку також називають цитохромом b₅ редуктазою, тоді як зниження метаНЬ за допомогою NADP метгемоглобінредуктази і глутатіону, як правило, має незначне значення [34].

Метгемоглобінредуктаза є флавопротеїном що містить кофермент флавінаденіндинуклеотид. Ензим має схожі властивості подібні до властивостей NADH-цитохром b_5 -редуктази мікросом печінки. Фермент не каталізує відновлення метгемоглобіну NADH, але потребує кофактора, який виконує роль проміжного переносника електронів між ферментом та метгемоглобіном. Еритроцитарний цитохром b_5 є переносником електронів метгемоглобіну та зв'язується з мікросомальним цитохромом b_5 [35].

На швидкість відновлення метгемоглобіну, однак, не впливає наявність кисню. Це явище пояснюється автоокисленням відновленого цитохрому b_5 киснем, який, тим не менш, знаходиться в повністю відновленому стані внаслідок швидкого відновлення ферментом і NADH. Тому на реакцію між метгемоглобіном і відновленим цитохромом b_5 , тобто швидкість відновлення метгемоглобіну, не впливає наявність кисню [36].

1.4. Гематологічні показники в лабораторній діагностиці

Гематологічні показники є важливою складовою діагностики і моніторингу функціонального стану організму. Аналіз крові дозволяє отримати інформацію про стан різних систем організму, зокрема імунної та кровотворної. Цей метод використовується для виявлення інфекційних, запальних процесів, анемій та інших захворювань. Визначення гематологічних показників є ключовим у кліні, оскільки відхилення від норми можуть сигналізувати про певні патологічні стани [37].

Еритроцити (RBC) є червоними кров'яними клітинами, які виконують надзвичайно важливу функцію транспортування кисню по всьому організму та видалення вуглекислого газу. Вони утворюються в кістковому мозку і мають здатність переносити кисень завдяки білку гемоглобіну, який містить залізо і надає крові червоний колір. Гемоглобін у складі еритроцитів зв'язує молекули кисню і забезпечує їх доставку до клітин, що необхідно для процесів клітинного метаболізму та вироблення енергії. Крім того, RBC підтримують кислотно-лужний баланс крові, що є важливим для оптимального

функціонування всіх систем організму. Рівень еритроцитів у крові може вказувати на загальний стан здоров'я і бути показником для діагностики різних патологій [38].

Зміни кількості еритроцитів від референтних значень можуть свідчити про різноманітні патологічні стани. Підвищений рівень еритроцитів може виникати при таких станах, як поліцитемія, яка може бути первинною (результат порушення в кістковому мозку) або вторинною, викликану такими факторами, як хронічна гіпоксія. Еритроцитоз може також бути наслідком серцевих захворювань або легеневої недостатності, коли організм намагається компенсувати недостатність кисню. Підвищений рівень RBC може спричиняти підвищення в'язкості крові, що збільшує ризик тромбозу і може призвести до серцево-судинних ускладнень. Зниження рівня еритроцитів називається анемією, що може бути викликано дефіцитом заліза, вітаміну B12, фолієвої кислоти, або іншими факторами, такими як хронічна крововтрата, порушення в кістковому мозку чи спадкові захворювання. Анемія призводить до гіпоксії тканин, що супроводжується такими симптомами, як втома, слабкість та головний біль. Хронічна анемія також може негативно впливати на роботу серця, спричиняючи його перевантаження через необхідність підвищення кровообігу для компенсації недостатнього кисню [39].

Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC) є одним із гематологічних показників, що відображає концентрацію гемоглобіну в еритроцитах. Цей параметр є важливим для оцінки стану еритроцитів, оскільки дозволяє оцінити насичення еритроцитів киснем. MCHC є показником, який дає інформацію про середню концентрацію гемоглобіну в еритроцитах, що, у свою чергу, пов'язане з ефективністю транспортування кисню до тканин і органів. Завдяки цьому параметру можна оцінити, чи отримують клітини достатньо кисню для нормального функціонування. MCHC дозволяє також діагностувати різні види анемій та порушення, пов'язані зі станом еритроцитів, і, на відміну від таких показників, як MCH (середній

вміст гемоглобіну в еритроциті), він фокусується саме на концентрації, а не на абсолютній кількості гемоглобіну [40].

Коли значення МСНС перевищує норму, це може свідчити про стан, відомий як сфероцитоз, який зазвичай є спадковим захворюванням. При цьому порушується структура мембрани еритроцитів, що спричиняє їхню підвищену крихкість і схильність до гемолізу. Гіперхромія також може виникати при важких опіках, оскільки в таких випадках може бути збільшена кількість гемоглобіну у порівнянні з об'ємом еритроцитів. Підвищений рівень МСНС може також спричинити зниження еластичності еритроцитів, що обмежує їхню здатність проходити через капіляри. Це може призвести до підвищеного ризику тромбозу та проблем з циркуляцією крові. Зниження МСНС зазвичай вказує на недостатнє насичення еритроцитів гемоглобіном, що часто виникає при залізодефіцитній анемії або інших видах гіпохромних анемій. В такому випадку еритроцити стають менш здатними переносити кисень, що призводить до гіпоксії тканин і може викликати такі симптоми, як слабкість, втома, головний біль та задишка [39].

Середній вміст гемоглобіну в еритроциті (МСН) є важливим показником гематологічного аналізу крові. Він показує середню кількість гемоглобіну в кожному еритроциті, що відображає ефективність доставки кисню до тканин організму. Підвищення МСН може вказувати на макроцитарну анемію, таку як анемія, спричинена дефіцитом вітаміну В12 або фолієвої кислоти. Це відбувається через те, що клітини збільшуються у розмірі та містять більше гемоглобіну, але кількість еритроцитів при цьому може бути зниженою. У цьому випадку організм відчуває нестачу ефективного транспортування кисню. Низький рівень МСН часто зустрічається при залізодефіцитній анемії. Коли організму не вистачає заліза для вироблення достатньої кількості гемоглобіну, кількість гемоглобіну в кожному еритроциті знижується. Такий стан спричиняє гіпохромію, що проявляється зниженням рівня МСН [41].

MCV показує середній об'єм кожного еритроцита та допомагає класифікувати анемії і виявляти інші захворювання, пов'язані зі змінами у

розмірах червоних кров'яних клітин. Підвищений MCV вказує на збільшені еритроцити та є типовим для макроцитарної анемії. Однією з найпоширеніших причин макроцитозу є дефіцит вітаміну B12 або фолієвої кислоти, необхідних для нормального поділу клітин. Інші причини включають захворювання печінки, гіпотиреоз і вплив деяких ліків, наприклад, хіміотерапевтичних засобів. Макроцитарна анемія призводить до менш ефективного транспортування кисню, оскільки збільшені еритроцити часто мають змінену форму і функціональність [40].

Низький MCV означає, що еритроцити мають менший за норму об'єм і часто асоціюється з мікроцитарною анемією, найпоширенішою причиною якої є залізодефіцит. Інші можливі причини включають спадкові захворювання, як-от таласемію, а також хронічні захворювання, які порушують обмін заліза [39].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкт та методи досліджень

Для проведення досліджень відібрано білих нелінійних щурів масою тіла 150-170 г. Впродовж експерименту тварини знаходились на стандартному раціоні віварію та утримувались по 1 тварині в клітці. Утримання та всі маніпуляції здійснювали згідно міжнародно-правових стандартів проведення експериментів із тваринами, що відображено в «Європейській конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових інших цілей» (18 березня 1986 р., м. Страсбург) та нормах «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених Першим національним конгресом з біоетики (20 вересня 2001 р., м. Київ).

Часткову резекцію печінки здійснювали методом, запропонованим дослідниками *Mitchell et Willenbring*. Резекцію проводили шляхом хірургічного видалення 2/3 частини печінки. Першим етапом був розтин черевної порожнини дослідної тварини стерильними хірургічними ножицями. Після чого хірургічним шовком перев'язували та, в подальшому, видаляли необхідні частини печінки. Наступним етапом було зашивання тварини стерильною хірургічною голкою. Перед проведенням операції приміщення кварцувалось та всі поверхності оброблялись 98% розчином етанолу. Під час проведення резекції тварини перебували під дією 2,5% розчину наркозу «Тіопенат».

Моделювання гострого токсичного ураження проводили через введення дослідним тваринам парацетамолу (ацетамінофену) в дозі 1250 мг/кг маси тіла тварини. Ксенобіотик вводили *per os* у формі суспензії на основі 2 % розчину крохмального гелю за 24 години до планової резекції тварин (*Gao et al.*, 2017).

Тварин розділили на групи :

- I група – інтактні тварини, яким проводили часткову гепатектомію (К/ЧГЕ).
- II група – тварини, яким проводили часткову гепатектомію після ураження ацетомінофеном (ТУ/ЧГЕ).

Умертвіння тварин здійснювали методом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом на 24, 48, 72 та 168 години.

Інтактні тварини (К) та щури з токсичним ураженням (ТУ), яким не проводили гепатектомію, були використані як групи дослідного контролю на 0 год.

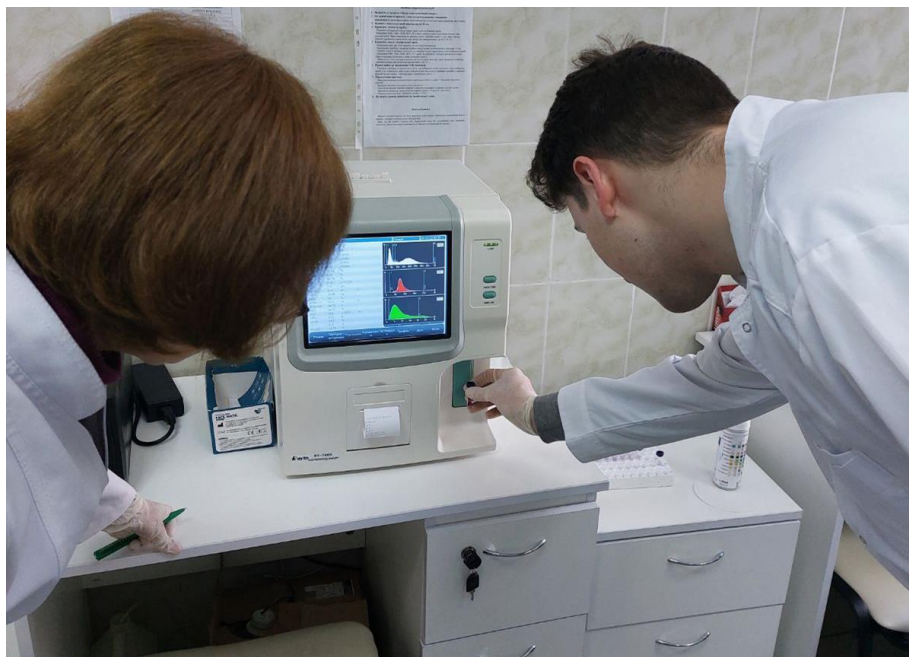
2.2. Відбір крові та отримання дослідного матеріалу

Забір крові у тварин проводили натще з ворітної вени печінки у завчасно підготовані та пронумеровані пробірки. В якості антикоагулянту використовували 5% розчин цитрату натрію. Умертвіння тварин, що вийшли з експерименту проводили в спеціально обладнаній, відповідно до її призначення, кімнаті. Пробірки з кров'ю центрифугували з частотою 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Під час центрифугування кров розділяється на фракції. Формені елементи крові осідають, в той час, як зверху пробірки залишається плазма. Після центрифугування отриману плазму за допомогою автоматичної піпетки обережно відбирали в еппендорфи, запобігаючи потраплянню в накінецьники піпетки формених елементів крові.

Забір крові для автоматизованого гематологічного дослідження здійснювали у спеціалізовані вакуумні пробірки, у яких як антикоагулянт використовується КЗ-ЕДТА. Концентрація сухого реагенту у пробірці становить 1,2-2,0 мг на 1 мл крові.

2.3. Визначення гематологічних показників

Для оцінки показників абсолютного вмісту еритроцитів, концентрації гемоглобіну в цільній крові, середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитарній масі, середнього вмісту гемоглобіну в окремому еритроциті та середнього об'єму еритроцита використовували автоматичний гематологічний аналізатор RT-7600 (Rayto, КНР) на базі КНП «Чернівецька міська поліклініка № 2 згідно договору про співпрацю.



2.4. Визначення вмісту загального гемоглобіну

Визначення вмісту загального гемоглобіну ацетонціангідриновим методом в цільній крові проводили за допомогою набору реактивів ПрАТ «Реагент» (Дніпро, Україна).

До складу набору входить:

1. Калібрувальний розчин гемоглобіну з концентрацією гемоглобіну 150,0 г/л (готовий до застосування);
2. Ацетонціангідрин;
3. Окислюючий розчин, у склад якого входить калій заліzosиньородистий 10,0 г/л та натрій двовуглекислий 50,0 г/л.

Приготування трансформуючого розчину проводили шляхом кількісного внесення 1 ампули ацетонціангідрину і 50 мл окислюючого р-ну в мірну колбу на 2000мл. Доводили до мітки дистильованою водою. Розчин зберігали у посуді з темного скла.

Принцип методу ґрунтується на взаємодії гемоглобіну з заліzosиньородистим калієм. Внаслідок окислення утворюється метгемоглобін, який з ацетонціангідрином утворює ціанметгемоглобін (геміглобінціанід).

Для отримання коректного результату реактиви попередньо витримували протягом 30 хв. при кімнатній температурі. Для проведення аналізу в пробірку додавали 100 мкл. цільної крові та 2,5 мл. трансформуючого розчину. Усі компоненти ретельно перемішували та витримували 15 хв при кімнатній температурі. Як контроль використовували 2,5 мл трансформуючого розчину. Вимірювання екстинкції дослідного та калібрувального зразків проводили на ФЕКу при довжині хвилі 540 нм. навіпроти холостої проби.

Розрахунок вмісту загального гемоглобіну проводять за формулою:

$$C_{\text{гемоглобіну}}, \text{ г/л} = E_{\text{дослід}} / E_{\text{каліб}} \cdot 150,0 \text{ де}$$

$C_{\text{гемоглобіну}}$ – вміст гемоглобіну в дослідній пробі, г/л;

$150,0$ – вміст гемоглобіну в калібрувальній пробі, г/л;

$E_{\text{дослід}}$ – екстинкція дослідної проби, од. абсорбції;

$E_{\text{каліб}}$ – екстинкція калібрувальної проби, од. абсорбції.

2.5. Визначення вмісту карбоксигемоглобіну

Метод визначення карбоксигемоглобіну у крові базується на вимірюванні величини екстинкції зразка при довжинах хвиль 534 і 563 нм.

Для виконання аналізу до 20 мкл зразка гемолізату додавали 2,5 мл 0,06 М фосфатного буферного розчину, рН 6,7-6,8 і ретельно перемішували. Колориметрували на ФЕКу при $\lambda = 534$ нм і $\lambda = 563$ нм. Кювету з товщиною шару 10 мм заповнювали підготовленим зразком, а як контроль використовували фосфатний буфер.

Розрахунок вмісту карбоксигемоглобіну проводили за формулою:

$$C_{\text{HbCO}} = \frac{(E_{534} - E_{563}) \cdot 0,719}{E_{563} \cdot 0,375} \times 100\%, \text{ де}$$

C_{HbCO} – вміст карбоксигемоглобіну в дослідній пробі, %;

E_{534} – екстинкція дослідної проби при довжині хвилі 534 нм, од. абсорбції;

E_{563} – екстинкція дослідної проби при довжині хвилі 563 нм, од. абсорбції.

2.6. Визначення вмісту метгемоглобіну

Принцип даного методу ґрунтується спекрофотометричних властивостях цих пігментів. Метгемоглобін характеризується максимальним поглинанням при $\lambda = 630$ нм, а оксигемоглобін – при $\lambda = 540$ нм. В еритроцитах обидва пігменти співіснують, що дозволяє одночасно визначати їхню концентрацію за відповідними значеннями поглинання.

Для визначення вмісту метгемоглобіну у пробірці А змішали 100 мкл гемолізату та 6 мл фосфатного буферу 17 ммоль/л, рН 6,8. У пробірку В до 3 мл фосфатного буферу 17 ммоль/л, рН 6,8 додали 300 мкл розчину з пробірки А та ресуспендували. Вимірювання абсорбції вмісту пробірки А при $\lambda = 630$ нм та пробірки В при $\lambda = 540$ нм. проводили на спектрофотометрі. Всі вимірювання проводилися навпроти фосфатного буферу 17 ммоль/л, рН 6,8.

Для розрахунку використовують формулу:

$$\% \text{ MetHb} = ([A] \text{ Tube A} \cdot 100) / ([A] \text{ Tube A} + ([A] \text{ Tube B} \cdot 10)), \text{ де}$$

$\% \text{ MetHb}$ – відсотковий вміст метгемоглобіну у відсотках;

$[A] \text{ Tube A}$ – оптична густина пробірки А при $\lambda = 630$ нм;

$[A] \text{ Tube B}$ – оптична густина пробірки В при $\lambda = 540$ нм.

2.7. Визначення активності метгемоглобінредуктази

Принцип методу ґрунтується на тому, що метгемоглобінредуктаза в присутності НАДН+Н⁺ здатна відновлювати метгемоглобін до оксигемоглобіну. При цьому відбувається зростання екстинкції реакційної суміші при $\lambda = 575$ нм.

До реакційної суміші додавали: 0,5 мл 0,01 М ЕДТА; 1 мл 0,05 М цитратного буферу рН 5; 1,8 мл 0,5 мМ K₃Fe(CN)₆; 40 мкл цільної крові. Отриману суміш доводили дистиллятом до 10 мл, перемішували та залишали на 1 год при кімнатній температурі. Потім центрифугували 10 хв при 3000 об. Після цього вимірювали екстинкцію надосадової рідини на спектрофотометрі при $\lambda = 575$ нм навпроти дистильованої води. Далі в кювету додавали 100 мкл. НАДН. (1 мг НАДН · 0,6 мл = 0,6 мл 1% НАДН на 6 проб) Суміш перемішували

та розпочинали вимір на час за допомогою секундоміра. Виміри екстинкції проводили спочатку на «нульовій» хвилині, а тоді через кожну хвилину (30 сек.) протягом 5 хв. Розраховували середній приріст екстинкції за 1 хв. Для обчислення активності метгемоглобінредуктази необхідна попередньо відоме значення концентрації гемоглобіну.

Активність *MetHb*-редуктази = $(\Delta E / \Delta t) \cdot 595 / Hb$, де

$\Delta E / \Delta t$ – середнє збільшення екстинкції за 1 хв при $\lambda = 575$ нм;

595 – коефіцієнт;

Hb – концентрація гемоглобіну в 1 л крові (г/л) .

2.8. Статистична обробка результатів

Для аналізу цифрового матеріалу експериментальних біохімічних досліджень проводили математичну обробку, що дало можливість оцінити достовірність результатів. Статистична обробка одержаних результатів здійснювалася на основі t-критерію Ст'юдента, використовуючи програму MicrosoftExcel.

За допомогою "Таблиці Т", запропонованої Ст'юдентом визначали імовірність можливої похибки в оцінці експериментальних результатів. Достовірними в біохімії, як правило, вважаються значення, для яких $P \leq 0,05$. Під час користування таблицею стандартних значень критерію Ст'юдента розраховували число ступенів свободи n' за формулою:

$$n' = n_1 + n_2 - 2,$$

де n_1 і n_2 кількість варіантів у рядах.

У таблиці стандартних значень критерію Ст'юдента в першому горизонтальному ряді наведені значення P , а в першому вертикальному ряді – значення n' . Цифри інших вертикальних рядів таблиці означають значення показника T . Вірогідною вважали різницю, якщо $P = < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Серед показників, що дозволяють оцінити функціональний стан організму, провести диференційну діагностику захворювань, важкості їх перебігу, спрогнозувати перебіг патологічного процесу, є гематологічні показники. До них можна віднести концентрацію загального гемоглобіну, кількість еритроцитів, а також різні еритроцитарні індекси. Відомо, що еритроцитарні індекси дозволяють оцінити як розмір еритроцитів, так і вміст у них гемоглобіну. Вони характеризують самі клітини, а не їх кількість, внаслідок чого є відносно стабільними параметрами [42].

Результати проведених досліджень показали, що в інтактних тварин, яким проводили часткову гепатектомію, спостерігається зниження рівня загального гемоглобіну впродовж перших трьох діб, а саме на 24, 48 та 72 години. Найнижчі значення зареєстровані на початкових етапах регенерації (24 год). Натомість у групі тварин із токсичним ураженням після часткової резекції печінки зниження даного показника відбувається впродовж всього експериментального періоду з найнижчими значеннями у період термінації (72 год) (рис. 3.1). Як видно з рисунку 1, на 0 годину спостерігається зниження рівня гемоглобіну в тварин із ацетамінофен-індукованим ураженням порівняно з показниками контролю.

Гемоглобін – це білок, що знаходиться в еритроцитах, основною функцією якого є зв'язування і транспортування кисню від легенів до тканин. Кожна молекула гемоглобіну є тетрамером, що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів глобіну. Утворення гемоглобіну відбувається шляхом синтезу глобіну та гему [43].

З літератури відомо, що зниження концентрації загального гемоглобіну в крові може виникати внаслідок різних причин, зокрема, крововтрати, що часто спостерігалися нами під час операційних утручань у групі щурів ТУ/ЧГ (внутрішні кровотечі ще до початку хірургічної операції); зменшення кількості еритроцитів, що призводить до розвитку анемії [41].

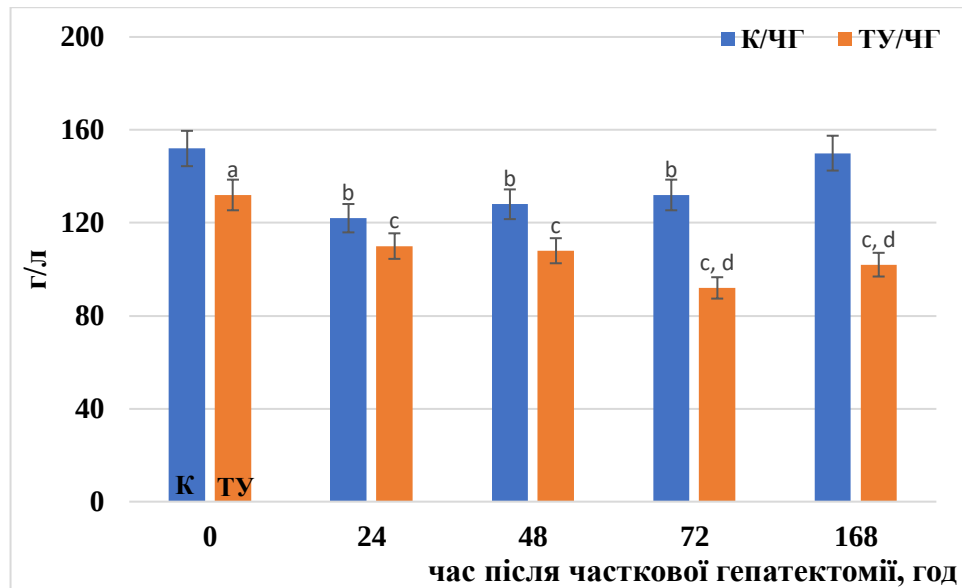


Рис. 1. Концентрація гемоглобіну в крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Примітка (тут і надалі):

К – інтактні тварини;

ТУ – тварини із токсичним ураженням;

К/ЧГ – контрольні тварини, яким проводили часткову гепатектомію;

ТУ/ЧГ – тварини із токсичним ураженням, яким проводили сегментарну часткову резекцію печінки;

а – статистично вірогідна різниця між показниками щурів групи ТУ та контролю, $P \leq 0,05$;

б – статистично вірогідна різниця показників групи К/ЧГ порівняно зі значеннями К на 0 годину, $P \leq 0,05$;

с – статистично вірогідна різниця між групами ТУ/ЧГ порівняно з показниками щурів групи ТУ на 0 годину, $P \leq 0,05$;

d – статистично вірогідна різниця між групами тварин ТУ/ЧГ порівняно з показниками К/ЧГ, $P \leq 0,05$.

Хірургічне втручання на печінці часто характеризується підвищеним ризиком післяопераційної кровотечі, пов'язаної з унікальною структурою печінки, можливим розшаруванням судин або порушенням коагуляції, пов'язаними з основним захворюванням печінки, що можливе за умов токсичного ураження медикаментозними ксенобіотиками. Ризик кровотечі підвищується залежно від об'єму, локалізації та типу резекції печінки. Частота розвитку анемії після операційних втручань на печінці становить близько 20% [44].

Причини анемії часто багатofакторні. Серед цих причин поширеними є залізодефіцитна анемія та функціональний дефіцит заліза. Еритропоез з обмеженням заліза виникає як при абсолютному, так і при функціональному дефіциті заліза. Функціональний дефіцит заліза характеризується дисбалансом між потребою в залізі та сироватковим залізом, яке легко доступне для ефективного еритропоезу. Функціональний дефіцит заліза часто спостерігається при хронічних захворюваннях і пов'язаний з підвищеним рівнем гепсидину.

Гепсидин – пептидний гормон, який синтезується печінкою і є ключовим регулятором системного гомеостазу заліза. Належить до білків гострої фази, бере участь в інфекційних та запальних процесах, забезпечує захист печінки від перевантаження залізом. Секретується у відповідь на підвищення рівня заліза та запалення. Гепсидин є негативним регулятором поглинання та переробки заліза. Він зв'язується з єдиним відомим клітинним експортером заліза феропортином, викликає його деградацію, тим самим зменшуючи відтік заліза з клітин-мішеней та знижуючи рівень сироваткового заліза. Головний механізм дії гепсидину полягає у блокуванні основних процесів поповнення заліза – всмоктування у дванадцятипалій кишці та вивільнення накопиченого заліза з гепатоцитів та макрофагів, внаслідок чого відбувається депонування заліза у цих клітинах. Макрофаги відіграють центральну роль у метаболізмі заліза та беруть участь у повторному використанні заліза із старіючих еритроцитів, що забезпечує більше 95% добової потреби в залізі для нормальних фізіологічних процесів, включаючи еритропоез [45].

Гепсидин відіграє роль у патогенезі анемії. Активація імунних клітин при запальних процесах супроводжується виробленням численних цитокінів, які індукують синтез гепсидину в печінці. Основним індуктором експресії гепсидину є ІЛ-6. Гепсидин зв'язується із залізо-експортним білком феропортином, призводить до його деградації, що перешкоджає клітинному експорту заліза, а також всмоктування заліза в кишечнику. Той самий механізм

перешкоджає експорту заліза з макрофагів, що призводить до низьких рівнів заліза в сироватці, посилюючи затримку заліза в макрофагах [46].

Після оперативних утручань на печінці потенційно існують 2 протилежні механізми, які можуть впливати на метаболізм заліза. По-перше, системна запальна відповідь після хірургічного втручання може викликати надмірну експресію гепсидину через медіатор запалення IL-6, що підтверджено попередніми дослідженнями наукової групи за умов токсичного ураження ацетамінофеном і, таким чином, обмежує доступне циркулююче залізо. По-друге, можна очікувати, що в результаті резекції печінки та подальшого зменшення маси печінки зменшиться кількість синтезованого гепсидину.

Тому в даному випадку достовірно говорити про розвиток анемії, оскільки з практичної точки зору основною характеристикою анемії є зменшенням вмісту гемоглобіну та/або еритроцитів в одиниці об'єму крові, що призводить до виникнення кисневого голодування тканин.

Підтвердженням цього слугує встановлене нами зниження кількості еритроцитів у крові щурів, яким проводили часткову гепатектомію. Як видно з рисунку 2, у крові інтактних щурів, яким проводили часткову резекцію печінки кількість еритроцитів знижується впродовж 72 год після операційних утручань та відновлюється до значень контролю (0 год) у віддалений період регенерації (168 год) (рис. 2). Водночас у групі тварин ТУ/ЧГ зниження рівня даного показника відбувається протягом всього експериментального періоду з мінімальними значеннями в період 72 та 168 год, що достовірно знижується порівняно з показниками групи К/ЧГ (рис. 2) та вказує на розвиток еритропенії.

Основними причинами зниження еритроцитів може бути їхнє прискорене руйнування або порушення їх синтезу кровотворними органами.

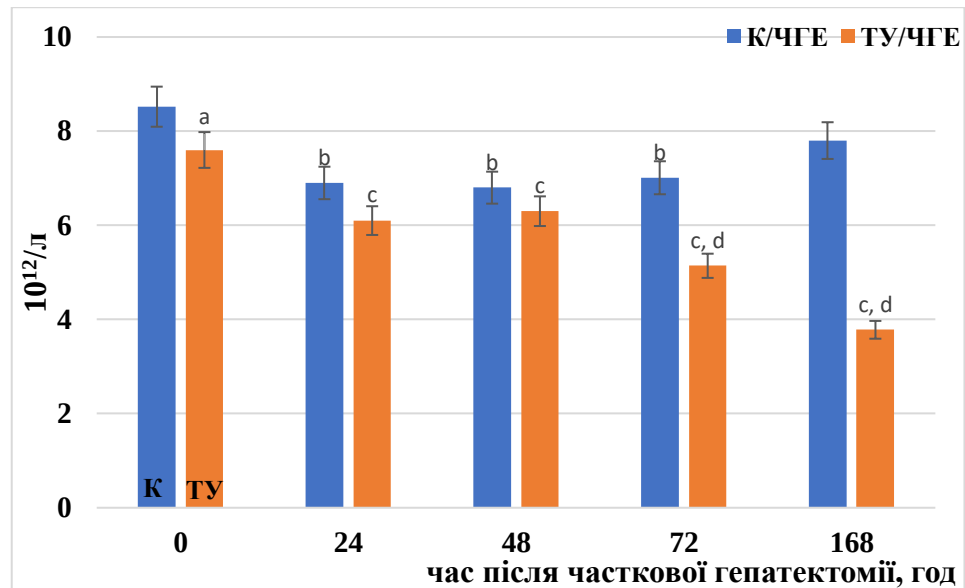


Рис. 2. Кількість еритроцитів у крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Післяопераційна анемія є частково фізіологічним явищем, і варіації після резекції печінки в різних групах можуть бути зумовлені різними інтерпретаціями. Наприклад, за умов токсичного ураження даний факт, ймовірно, зумовлений переважанням інтенсивності гемолізу (руйнування) еритроцитів, що переважає над їх утворенням. Попередніми дослідженнями наукової групи в розрізі даної тематики показано, що вже за умов токсичного ураження ацетамінофеном порівняно з показниками контролю відбувається гемоліз еритроцитів внаслідок зниження їх осмотичної резистентності [47]. Тому за даних експериментальних умов зниження кількості еритроцитів, вірогідно, пов'язане саме з їх прискореним гемолізом. Наслідком цього є розвиток кисневого голодування – гемічної гіпоксії.

Еритроцит людини — це високоспеціалізована тканина, яка відповідає за транспорт кисню. Його ключовими компонентами є еритроїдний кістковий мозок, який відповідає за виробництво еритроцитів (еритропоез), і циркулюючі еритроцити, які транспортують кисень від легень до кожної клітини тіла. У здорових людей приблизно $2,5 \times 10^6$ ретикулоцитів вивільняються в кровообіг щосекунди. Провівши приблизно 120 днів у

кровообігу, старіючі еритроцити фагоцитуються ретикулоендотеліальними клітинами в селезінці, печінці та самому кістковому мозку. Еритропоез головним чином регулюється еритропоєтином, який виробляється апаратом, що сприймає кисень у нирках, циркулює в периферичній крові як справжній гормон і надає свою дію шляхом зв'язування з поверхневим рецептором, присутнім на еритроїдних клітинах-попередниках в кістковому мозку.

З патофізіологічної точки зору анемія може виникати внаслідок 3 різних аномалій еритрону, які пов'язані з проліферацією еритроїдних попередників, їх дозріванням або виживанням еритроцитів у кровообігу. Отже, можна визначити 3 основні патогенетичні механізми анемії: еритроїдна гіпопроліферація, неефективний еритропоез і периферичний гемоліз. Наприклад, еритроїдні попередники практично відсутні в кістковому мозку пацієнтів з важкою апластичною анемією або чистою аплазією червоних клітин, з мінімальним вивільненням ретикулоцитів у кровообіг або без нього. Навпаки, кількість незрілих еритроцитів може досягати 10-кратної норми в кістковому мозку пацієнтів із проміжною β -таласемією; незважаючи на це, виробництво еритроцитів є недостатнім через апоптоз еритробластів на пізніх стадіях і недостатнє виробництво ретикулоцитів. У пацієнтів з важкою гемолітичною анемією кількість ретикулоцитів, що вивільняються в кровообіг, може перевищувати норму в >10 разів, але новоутворені еритроцити часто виживають у кровообігу лише кілька днів, що призводить до анемії [48].

Відомо, що гемоліз супроводжується лізисом еритроцитів та вивільненням гемоглобіну у плазму крові. Внаслідок цього вільний гемоглобін може зв'язуватися з NO, що викликає звуження судин і підвищення артеріального тиску. Таке явище часто відбувається внаслідок видалення частин печінки [49].

Одним з видів гемолізу є екстравазкулярий гемоліз, що відбувається поза судинним руслом. Механізм його полягає в руйнуванні макрофагами структурно дефектних або аномальних еритроцитів [50]. Коли такі еритроцити фагоцитуються ретикулоендотеліальними клітинами (макрофагами),

гемоглобін розщеплюється на компоненти, а катаболізм протопорфіринового кільця гема призводить до утворення білірубіну [48]. Даний факт узгоджується із результатами попередніх досліджень в розрізі даної тематики, де встановлено, що на початкових стадіях регенерації печінки (24 та 48 год) у щурів із токсичним ацетамінофен-індукованим ураженням підвищення концентрації загального білірубіну в сироватці крові відбувається за рахунок зростання кількісного вмісту як прямої, так і непрямой фракції, тоді як під час фази термінації (72 год) та у віддалений період (168 год) переважає некон'югована гіпербілірубінемія.

Також до ймовірних причин зниження даного показника можна віднести виникнення внутрішньосудинного гемолізу. Даний механізм проявляється активацією системи комплементу та виникненням пор в мембранних клітинах, що призводить до порушення осмотичного балансу і подальшого лізису клітин.

Отже, після часткової резекції тканин печінки у щурів із токсичним ураженням зниження концентрації гемоглобіну та зменшення кількості еритроцитів відбувається впродовж усього регенеративного періоду із поглибленням стану анемії та еритропенії у фазу термінації (72 год) та віддалений період (168 год).

Нині при діагностиці захворювань різного генезу, щоб спрогнозувати перебіг патологічного процесу вагома роль належить еритроцитарним індексам, до яких належать середній об'єм еритроцита (*mean corpuscular volume*, MCV), середній вміст гемоглобіну в еритроциті (*mean corpuscular haemoglobin*, MCH), середня концентрація Hb в еритроциті (*mean corpuscular haemoglobin concentration*, MCHC) та діапазон розподілу еритроцитів за об'ємом (*red blood cell volume distribution width*, RDW) [51].

Важливим клініко-лабораторним показником, що використовується для виявлення причин анемії є середній об'єм еритроцитів (MCV). MCV є мірою середнього розміру еритроцита в кровоносній системі, і він в основному використовується як показник для диференціальної діагностики анемії. У

поєднанні зі значеннями гемоглобіну, середній об'єм еритроцитів дозволяє класифікувати анемію на три основні типи – мікроцитарну, нормоцитарну та макроцитарну [52].

Попередніми дослідженнями встановлено, що показник середнього об'єму еритроцитів знижується за умов введення токсичних доз ацетамінофену. Даний факт може бути зумовлений порушенням процесу еритропоезу, внаслідок чого утворюються зменшені та деформовані еритроцити [47].

Результати наших досліджень показали, що в групі тварин К/ЧГ показник середнього об'єму еритроцитів у крові інтактних тварин не змінюється до 72 год після часткової резекції органу та достовірно зростає у віддалений термін регенеративного процесу (168 год) (рис. 3). Такі зміни в цьому часовому проміжку засвідчують збільшення об'єму еритроцитів у даній групі щурів, що вказує на вірогідний розвиток макроцитозу [53].

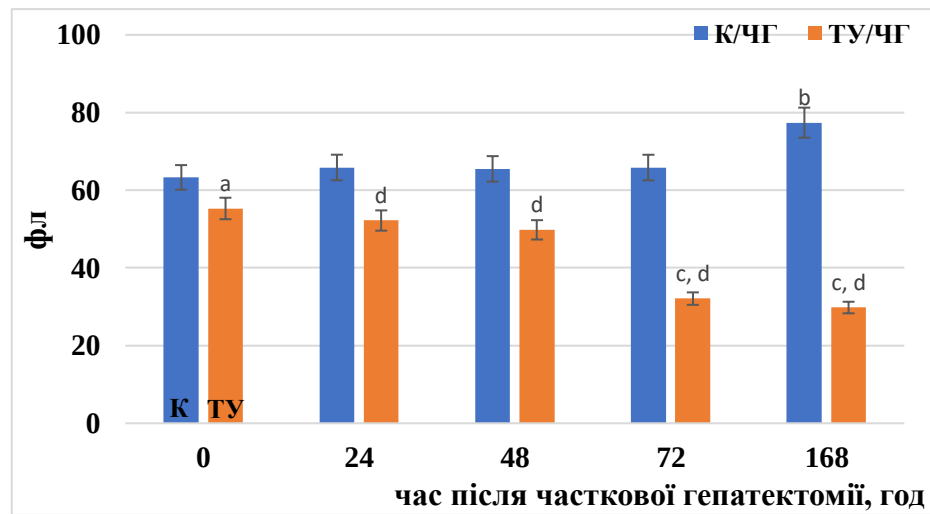


Рис. 3. Середній об'єм еритроцитів (MCV) крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Розмір еритроцитів відображається в повному аналізі крові як середній корпускулярний об'єм (MCV). У деяких випадках виявлення макроцитозу може не вимагати подальшого обстеження або лікування. Однак практикуючі клініцисти повинні розуміти важливість макроцитозу в потенційному розвитку

макроцитарної анемії, а також діапазон патологій, які може означати макроцитоз, часто залучаючи позагематологічні системи органів.

У більшості випадків етіологія макроцитозу може бути пов'язана з аномальним розвитком еритроцитів, аномальним складом мембрани еритроцитів, збільшенням кількості ретикулоцитів або комбінацією цих 3 факторів. Аномальний розвиток еритроцитів може виникнути в таких умовах, як дефіцит вітаміну В12 або фолієвої кислоти [54].

Збільшення кількості ретикулоцитів безпосередньо збільшує MCV, оскільки ці незрілі еритроцити в середньому значно більші. Ретикулоцитоз може виникнути як відповідь на гемолітичну або крововтратну анемію. Лікування макроцитозу залежить від етіології та наявності або відсутності супутньої анемії. Якщо макроцитоз є відносно помірним без значної анемії, що підтверджено нашими дослідженнями щодо рівня загального гемоглобіну (рис. 1) та кількості еритроцитів (рис. 2), то коригування даного показника в лабораторно-діагностичній практиці не потрібне.

Також до причин виникнення макроцитозу належить втрата та недостатній синтез необхідних для нормального кровотворення макроелементів, які знаходяться в печінці. До таких елементів належить залізо, нікель, мідь та цинк [55].

Натомість в групі ТУ/ЧГ спостерігається абсолютно протилежна тенденція змін показника MCV, що характеризується зниженням на 72 та 168 годину після часткової резекції (рис. 3). Зменшення середнього об'єму еритроцитів у період термінації та віддаленні терміни після ЧГ призводитиме до виникнення мікроцитарної анемії.

Зазвичай мікроцитоз виникає через дефіцит заліза в організмі та, як наслідок, порушення синтезу гемоглобіну, внаслідок чого еритроцити стають меншими і знижують свою ефективність у транспортуванні кисню. Також до причин зниження даного показника можна віднести порушення еритропоезу, та, як наслідок, утворення еритроцитів меншого розміру [47].

Запальні стани, що характерно для тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном, та підтверджено попередніми дослідженнями наукової групи [56] часто супроводжуються мікроцитарною анемією. Причина цієї анемії подвійна. По-перше, вироблення нирками еритропоєтину пригнічується запальними цитокінами, що призводить до зниження вироблення еритроцитів. По-друге, дефіцит заліза для розвитку еритроцитів може призвести до мікроцитозу. Дефіцит заліза значною мірою зумовлений гепсидином – білком гострої фази, який призводить як до зниження всмоктування заліза, так і до зменшення вивільнення заліза із запасів організму. Білок феропортин опосередковує клітинний відтік заліза. Гепсидин зв'язується з феропортином і пригнічує його, тим самим блокуючи залізо, поглинене ентероцитами, від потрапляння в кровообіг, а також запобігаючи вивільненню заліза з його запасів в організмі до еритроцитів, що розвиваються [57].

На сьогоднішній день діагностика середнього вмісту гемоглобіну (МСН) в еритроциті є невід'ємною складовою загального аналізу крові. В комплексі з попередньо дослідженими гематологічними показниками, він дозволяє виявити ознаки захворювань на ранній стадії. МСН являє собою середню кількість гемоглобіну в еритроцитах, а не кількість гемоглобіну, необхідного для розподілу та доставки кисню до тканин. Зміни середнього вмісту гемоглобіну в еритроциті вказують на структурні зміни в еритроцитах та на порушення синтезу гемоглобіну. На підставі цього індексу анемії можна розділити на нормо-, гіпо- і гіперхромні.

Нами встановлено, що в тварин групи К/ЧЕ зміни даного показника зареєстровані лише на ранніх стадіях (24 та 48 год) після часткової резекції тканини печінки (рис. 4). Це дозволяє говорити про розвиток явища нормохромії. Наприклад, нормохромія характерна і для здорових осіб, але може зустрічатися при гемолітичних та апластичних анеміях, а також анемії, пов'язаної з гострою крововтратою. В нашому випадку швидше за все зниження даного показника лише на ранніх етапах регенеративного процесу є післяопераційним явищем втрати крові.

Щодо групи тварин ТУ/ЧГ, то зниження даного показника відбувається впродовж всього експериментального періоду з найнижчими показниками МСН на стадії термінації (72 год) та у віддалений період (168 год), що обумовлено розвитком гіпохромної анемії (рис. 4). Даний факт призводить до кисневого голодування тканин і органів організму, що є наслідком дефіциту заліза в крові. Дефіцит заліза зумовлений недостатнім поглинанням заліза нормобластами кісткового мозку, і, як наслідок, порушується синтез гему [47]. Окрім того, гіпохромія може бути зумовлена зменшенням об'єму еритроцитів (мікроцитоз), що підтверджено нашими дослідженнями в даній групі тварин (рис. 3).

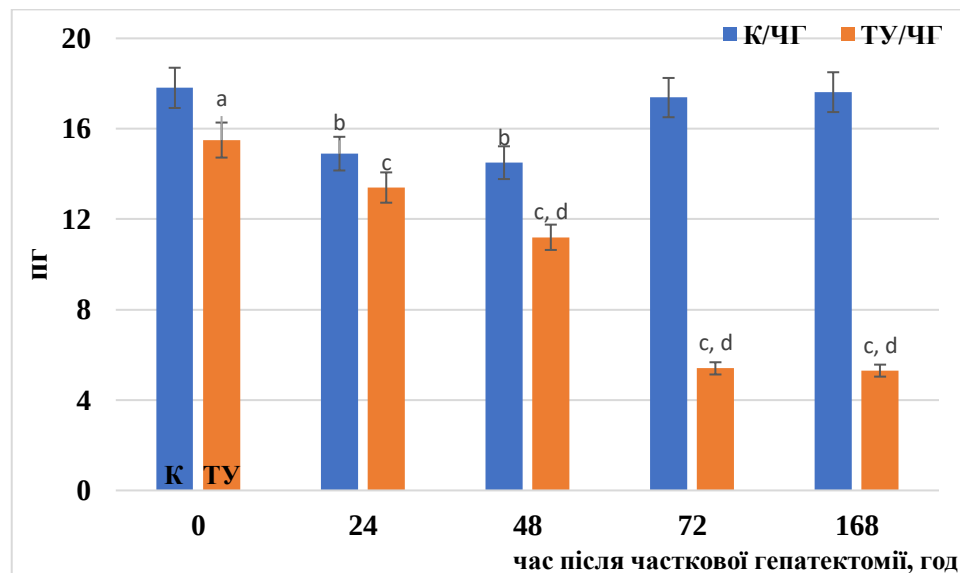


Рис. 4. Середній вміст гемоглобіну (МСН) в еритроцитах крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Гіпохромія – це істинний показник дефіциту заліза в організмі (залізодефіцитна анемія) або залізорефрактерності, тобто порушення засвоєння заліза нормобластами червоного кісткового мозку, що призводить до порушення синтезу гему (деякі гемоглобінопатії, порушення синтезу порфіринів) [58].

Поряд з цим нами досліджено середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті (МСНС), що визначає ступінь насиченості еритроцитів гемоглобіном. Фактично МСНС — це показник концентрації гемоглобіну на

об'єм упакованих еритроцитів. Якщо знижена швидкість синтезу гемоглобіну є вищою, ніж зменшений синтетичний об'єм еритроцитів, то рівень МСНС знижується. Таким чином, низьке значення МСНС являє собою оцінку наявності відносної гіпохромії.

З рисунку 5 видно, що зниження середньої концентрації гемоглобіну в групі інтактних щурів, яким проводили часткову резекцію тканини печінки до стадії термінації (72 год) узгоджується з отриманими результатами по зниженню загального гемоглобіну в крові (рис. 1) та зниженням загальної кількості еритроцитів (рис. 2). Натомість у тварин групи ТУ/ЧГ достовірні зміни даного показника, що надає інформацію про концентрацію гемоглобіну в кожному еритроциті, зареєстровані впродовж всього періоду регенерації органу з найнижчими значеннями на віддалених етапах відновлення паренхіми печінки (72 та 168 год).

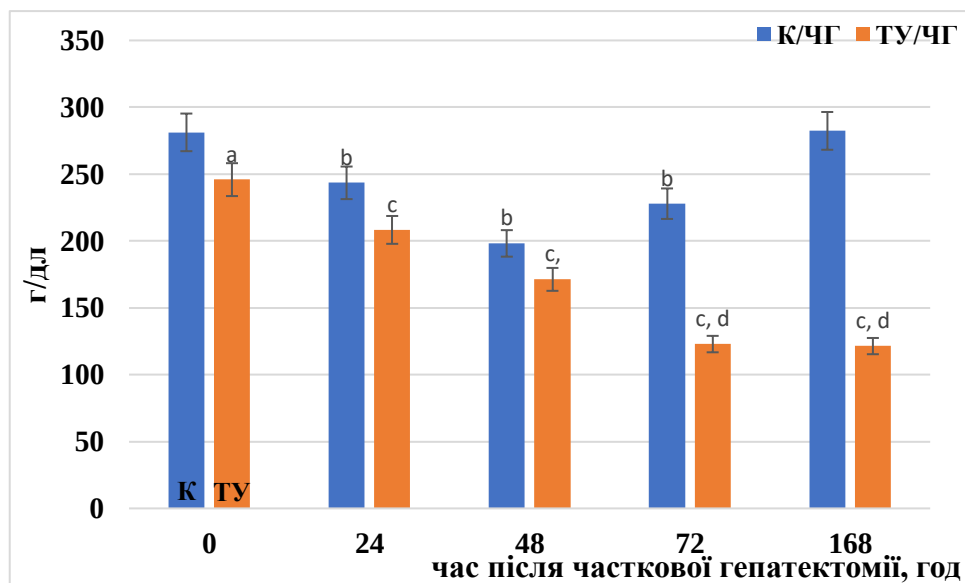


Рис. 5. Середня концентрація гемоглобіну (МСНС) в еритроцитах крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Якщо рівень МСНС знижується протягом тривалого періоду, оксигенація органів зменшується. У гіпохромії беруть участь різні механізми. Перш за все, існує ймовірність існування проблеми з наявністю або адгезією заліза до гемоглобіну. Інші механізми можуть бути пов'язані з нирковою недостатністю,

що підтверджено науковою групою експериментально при оцінці морфологічних змін у групі щурів із токсичним ураженням ацетамінофеном, коли патологічні процеси в нирках викликають недостатність або резистентність еритропоєтину. Крім того, існує ймовірність ефекту розведення, оскільки зміни осмотичного тиску можуть теоретично впливати на відносну концентрацію гемоглобіну в еритроциті [59].

Незважаючи на низький рівень специфічності, найвища чутливість робить цей індекс більш вигідним серед усіх індексів еритроцитів та дозволяє використовувати як незалежний фактор прогнозу гіпохромної мікроцитарної анемії.

Отже, відновлення тканин печінки після часткової гепатектомії у контрольних щурів характеризується незначною нормохромією внаслідок зниження середнього вмісту та концентрації гемоглобіну в еритроцитах на ранніх етапах регенерації з віддаленим ефектом макроцитозу. Часткова резекція печінки у тварин із токсичним ураженням супроводжується розвитком гіпохромної мікроцитарної анемії із посиленням на термінальних стадіях (72 та 168 год) регенераційного процесу.

Поняття «загальний гемоглобін» поєднує всі його деривати. Існують десятки похідних гемоглобіну, що класифікуються за лігандом, пов'язаним з атомом заліза гему. У найбільшій кількості (>1%) у крові людини виявляються чотири основні похідні: оксигемоглобін (O_2Hb), відновлений гемоглобін, або дезоксигемоглобін (Hb), карбоксигемоглобін ($COHb$) і метгемоглобін ($MetHb$) [60].

Тому наступним етапом нашої роботи стало дослідження рівня карбоксигемоглобіну та метгемоглобіну в крові інтактних щурів та тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном за умов часткової гепатектомії.

Результати проведених нами досліджень показали, що в крові інтактних щурів після часткової гепатектомії рівень карбоксигемоглобіну не змінюється впродовж всього регенераційного процесу (рис. 6). Водночас у тварин із

токсичним ураженням ацетамінофеном відсоткова кількість СОНб зростає, починаючи з 72 год процесу відновлення паренхіми печінки (рис. 6).

Підвищення рівня СОНб у даній групі тварин у період термінації та віддалений період може бути спричинене комплексом метаболічних, фізіологічних і патологічних змін, які відбуваються в організмі внаслідок самого процесу гепатектомії. Основною причиною може бути збільшення продукції ендogenous СО та/або зниження його виведення.

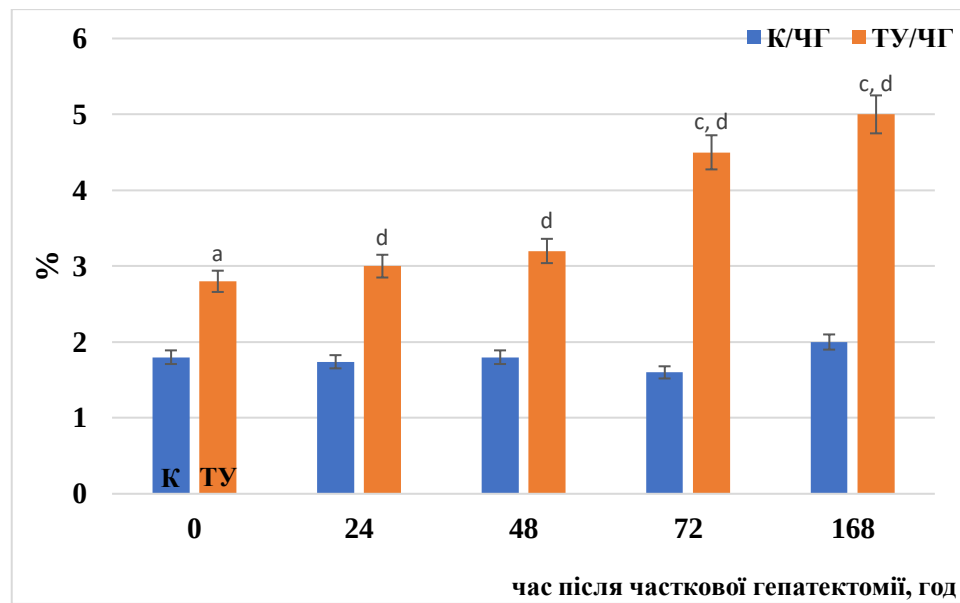


Рис. 6. Рівень карбоксигемоглобіну в крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Оксид Карбону (СО) широко відомий як «тихий вбивця» через його високу спорідненість з Нб, утворюючи карбоксигемоглобін (СОНб). СО має в 240 разів більшу спорідненість до Нб, ніж O_2 , обмежуючи доставку O_2 у тканини, що може призвести до системної гіпоксії. Цікаво, що СО, частково зв'язуючись з гемоглобіном, збільшує спорідненість інших молекул O_2 до гемоглобіну, обмежуючи їх вивільнення в тканини.

З високою спорідненістю СО до Нб можна очікувати, що зберігання ендogenous виробленого СО відбувається у формі СОНб. У фізіологічних умовах СО безперервно виробляється шляхом катаболізму вільного гему, що відповідає понад 90% ендogenous виробництва СО, а решта СО надходить із

метаболізму ліпідів і ксенобіотиків. Таким чином, за фізіологічних умов доросла людина утворює 20–50 мл видихуваного СО на добу. З іншого боку, 10–15% нормального обміну еритроцитів відбувається шляхом судинного гемолізу, витоку гемоглобіну (Hb) і вільного гему в плазму. Таким чином, ендогенний СО поглинається Hb, що призводить до базального виробництва СОНb. Дійсно, базальний рівень циркулюючого СОНb у людини, яка не курить, становить від 0,1 до 2%, залежно від умов навколишнього середовища [31].

Водночас за умов патологічних станів (у відповідь на запалення, окислювальний стрес, гіпоксію тощо) рівні експресії гемоксигенази-1 зростають разом із утворенням СО. Тому також відбувається підвищення рівня циркулюючого СОНb. Гемоксигеназа переважно експресується в печінці, і хоча об'єм функціональної тканини зменшується, інтенсивна експресія цього ферменту в залишкових гепатоцитах та в тканинах інших органів (селезінка, легені, кістковий мозок) може значно підвищити загальну продукцію СО. Це є компенсаторним механізмом, який спрямований на зменшення оксидативного стресу та захист клітин від пошкодження. Дані зміни є характерними як для інтактних тварин, так і для тварин із токсичним ураженням [61].

Важливим механізмом є посилений катаболізм гемоглобіну та цитохромів. У ході катаболізму гему еритроцитів (включаючи руйнування частини клітин під час еритропоезу у кістковому мозку) утворюється близько 79% ендогенного СО; решта його частини (до 21%) формується в результаті розщеплення міоглобіну, цитохромів, металовмісних ферментів (каталаза, пероксидаза, триптофанпіролаза, гуанілатциклаза, NO-синтаза та ін), перекисного окислення ліпідів, а також дії ксенобіотиків та деяких бактерій. Після резекції печінки, особливо за умов гіпоксії або ішемії, може відбуватися масивний розпад еритроцитів або пошкодження клітинних мембран, що супроводжується вивільненням гему та стимулює його перетворення на СО. Ендогенна продукція СО зростає при гемолізі, що підтверджується зниженням

кількості еритроцитів у групі тварин ТУ/ЧЕ особливо на термінальних стадіях регенерації печінки (рис. 2).

Токсична дія монооксиду вуглецю на організм зумовлена сумарним ефектом гіпоксичної гіпоксії (внаслідок зниження парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі); гемічної гіпоксії (в результаті утворення СОНб); гіпоксії (через інактивацію ферментів тканинного дихання).

У біологічних системах СО зв'язується з гемовими білками, змінюючи їх функцію. Насправді інтоксикація, спричинена СО, зазвичай пов'язана з недостатньою системною доставкою кисню, як згадувалося раніше, тоді як цитотоксичність здебільшого пов'язана зі зв'язуванням СО з цитохром-с-оксидазою, яка, у свою чергу, пригнічує мітохондріальне дихання, що призводить до дефіциту АТФ і окисного стресу [62].

Протягом десятиліть рівень циркулюючого СОНб вважався мірою інтоксикації СО. Тим не менш, велика різноманітність концентрацій СОНб пов'язана зі смертельною інтоксикацією СО, коливалась від 3% до 98%. Важливо відзначити, що при такому широкому діапазоні значень його статистична значущість майже не має сенсу. Крім того, найвище зареєстроване значення рівня СОНб в особи, яка вижила, становить 73%, що підтверджує тезу, що СОНб не має точної кореляції з отруєнням СО. Тому СОНб слід використовувати лише як підтверджуючий біомаркер нещодавнього впливу СО.

Таким чином, СОНб в циркуляції не є токсичним, і концентрацію СОНб в циркуляції не слід вважати мірою системної токсичності СО. Подібним чином токсичність, спричинена СО, може бути пов'язана переважно з газоподібним СО, який зв'язується з білками клітинного гемму, зокрема цитохром-с-оксидазою.

Періопераційна анемія є досить поширеним явищем та пов'язана із смертністю; і ризик цих наслідків зростає з тяжкістю анемії. В даний час порогові значення концентрації гемоглобіну (Hb) використовуються для визначення тяжкості анемії та її моніторингу; однак біологічні наслідки цих

меж незрозумілі, особливо на рівні окремої особини. Люди та досліджувані ссавці мають стійку адаптивну серцево-судинну відповідь на гостру анемію з метою підтримки оптимальної перфузії життєво важливих органів. Експериментальні дослідження демонструють, що важливі гіпоксичні клітинні механізми активуються під час гострої, підгострої і хронічної анемії у відповідь на зниження вмісту кисню в крові. Гіпоксія тканин, спричинена анемією, біологічно визначається за допомогою багатьох механізмів, включаючи фактор, що індукує гіпоксію (HIF), і нейрональну синтазу оксиду азоту (nNOS). Ці клітинні механізми сприяють оптимізації доставки кисню та гіпоксичної адаптації клітин для сприяння виживанню. Однак ці адаптивні механізми врешті-решт стають перевантаженими, як вказують докази збільшення ушкодження органів і смертності, що спостерігаються при поступовому зниженні рівня гемоглобіну [63].

У хірургічних умовах найбільш доступним методом невідкладного лікування анемії є переливання еритроцитів. Однак переливання крові — це втручання, яке включає високий рівень осмолярної рідини, еритроцитів (з різним рівнем через вік), а також уламків, які можуть викликати запальну реакцію. Рішення про переливання є складним і має прийматися лише тоді, коли його чиста користь переважає ризики, пов'язані з анемією. Останні рекомендації з клінічної практики рекомендують переливання еритроцитів, коли спостерігається важка форма анемії [64].

Метгемоглобін плазми був запропонований як біомаркер тканинної гіпоксії, спричиненої анемією. Існує гіпотеза про низку фізіологічних механізмів, які сприяють окисленню гемоглобіну до метгемоглобіну під час анемічної гіпоксії.

Нами встановлено, що в групі щурів К/ЧГ відбувається зростання рівня метгемоглобіну лише на початкових етапах регенерації (24 год) та в період активної проліферації клітин (48 год) порівняно зі значення 0 год групи контролю (рис. 7). Щодо групи тварин із токсичним ураженням, яким здійснювали часткову гепатектомію, то підвищення відсоткового рівня даного

показника спостерігається впродовж усього експерименту з максимальними значеннями на 24 год та 48 год (рис. 7).

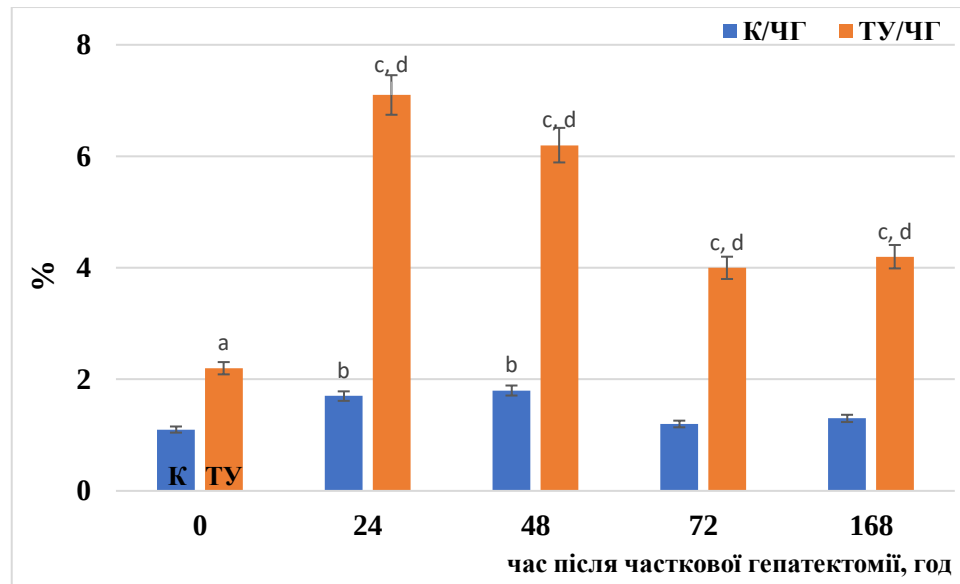


Рис. 7. Рівень метгемоглобіну в крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

MetHb утворюється, коли двовалентне залізо (Fe^{2+}) гемової групи гемоглобіну (Hb) окислюється до тривалентного заліза (Fe^{3+}). Двовалентне залізо MetHb не здатне зв'язувати кисень (O_2). Таким чином, крива дисоціації O_2 зсувається вліво, що ускладнює вивільнення O_2 і забезпечення належної оксигенації тканин. Утворення MetHb також призводить до меншої кількості Hb, доступного для зв'язування та транспортування O_2 [65].

MetHb безперервно виробляється у фізіологічних умовах в обмеженій кількості внаслідок автоокислення, але він швидко перетворюється назад на Hb переважно за допомогою НАДН-залежної цитохром-b5-редуктази (також відомої як MetHb-редуктаза) і в обмеженій кількості відновлюється також аскорбатом і глутатионом.

Причиною підвищення даного показника в тварин із токсичним ураженням після ЧГ є утворення реактивних форм кисню та інших окислювальних метаболітів у процесі метаболізму ацетамінофену. У печінці препарат метаболізується ферментами системи цитохрому P450 до

реактивного токсичного метаболіту N-ацетил-p-бензохіноніміну (NAPQI). У невеликих кількостях NAPQI детоксикується шляхом зв'язування з глутатіоном. При токсичних дозах ацетамінофену запаси глутатіону виснажуються, що призводить до накопичення NAPQI і активних кисневих метаболітів, які сприяють окисленню гемоглобіну до метгемоглобіну.

Існує три основні механізми, які були запропоновані для генерації метгемоглобіну під час анемії, що виявлено нами в групі тварин ТУ/ЧГ із посиленням ефектів на термінальних етапах регенерації. По-перше, під час гострої анемії спостерігається підвищений рівень дезоксигемоглобіну в мікроциркуляції, який може легко окислюватися до метгемоглобіну. По-друге, під час гострої анемії відбувається підвищення регуляції nNOS, що може сприяти підвищенню рівня оксиду азоту, отриманого з nNOS, у судинній системі, що ще більше сприяє окисленню гемоглобіну до метгемоглобіну. По-третє, сам дезоксигемоглобін може діяти як нітритредуктаза, і в процесі утворення оксиду азоту метгемоглобін утворюється як побічний продукт [66].

Окрім того, у роботах дослідників [67] показано невелике, але постійне підвищення рівня метгемоглобіну, пропорційне різкому зниженню гемоглобіну на доклінічних тваринних моделях гемодилуційної анемії. Біологічна вірогідність і послідовні докази в контексті відносної простоти, низької вартості та швидкого часу отримання результатів нині роблять метгемоглобін потенційним біомаркером для вимірювання спричиненої анемією тканинної гіпоксії.

Тому ми припускаємо, що метгемоглобін може бути біологічним маркером спричиненої анемією гіпоксії тканин на ранніх стадіях регенерації печінки щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії.

Метгемоглобін є продуктом окислення Fe^{2+} у складі гему до Fe^{3+} , при цьому залізо втрачає здатність зв'язувати і транспортувати кисень. В організмі людини постійно з'являються можливості для ендогенного окислення заліза гема з утворенням MetHb; основною причиною окислення є сам кисень.

Накопичення метгемоглобіну в організмі зазвичай не відбувається, оскільки здатність еритроцитів відновлювати окислений гем у багато разів перевищує швидкість його спонтанного окиснення. Відновлення MetHb в Hb здійснюється за допомогою спеціальних систем, основним компонентом яких є цитохром b₅-редуктаза (НАДН-метгемоглобінредуктаза) – на її частку припадає близько 70 % відновленого гемоглобіну, а також аскорбінова кислота (12-16%) та глутатіон (9-12%). Даний фермент редукує тривалентне залізо (Fe³⁺) у гемі до двовалентного стану (Fe²⁺), відновлюючи функціональність гемоглобіну. У випадках, коли інтоксикація не призводить до повного виснаження ферментативної активності або відновлювальних коферментів, цей механізм може ефективно працювати, поступово знижуючи рівень MetHb.

Ще один шлях відновлення MetHb пов'язаний з ферментом НАДФН-метгемоглобінредуктазою, яка активується екзогенними акцепторами електронів, наприклад, рибофлавіном та метиленовим синім. На частку НАДФН-метгемоглобінредуктази припадає 5-6% відновленого гемоглобіну [68].

Нами встановлено, що в групі інтактних тварин, яким проводили часткову резекцію тканин печінки спостерігається підвищення активності метгемоглобінредуктази на ранніх стадіях регенеративного процесу – 24 год та 48 год порівняно зі значеннями контролю (0 год) (рис. 8.).

Можна припустити, що підвищення активності метгемоглобінредуктази в групі К/ЧГ на початкових етапах відновлення паренхіми печінки є результатом компенсаторної реакції організму на посилення прооксидантних процесів та накопичення метгемоглобіну, що показано на рис. 7. З іншого боку, підвищення активності даного ензиму може бути зумовлене посиленням метаболізму NADH у клітинах, оскільки ця молекула є донором електронів для ферменту. За умов гіпоксії та окислювального стресу посилюються гліколітичні реакції, внаслідок чого зростає рівень NADH, що забезпечує еритроцити необхідною енергією для відновлювальних процесів.

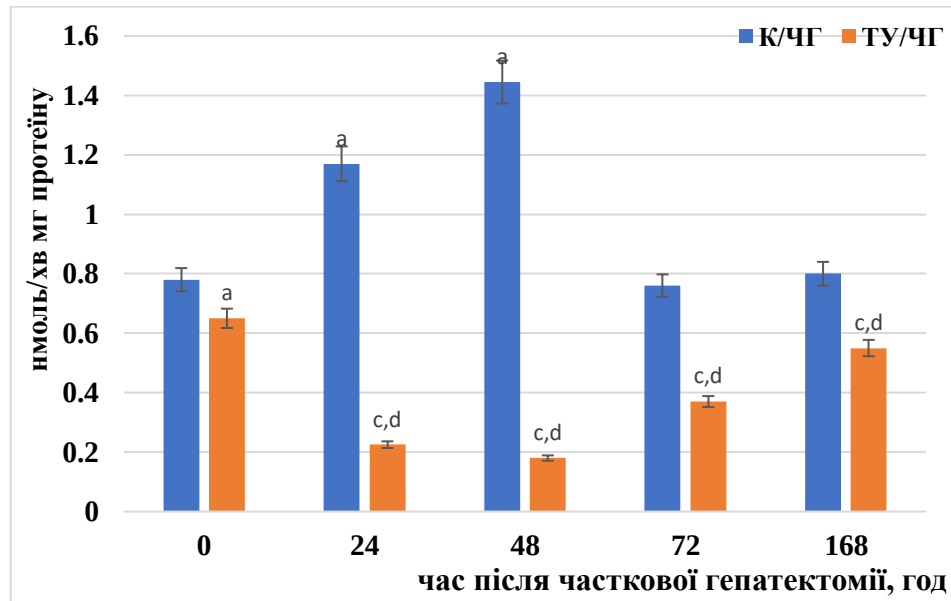


Рис. 8. Активність NADH-метгемоглобінредуктази в крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії

Водночас у щурів із токсичним ураженням, яким здійснювали часткову гепатектомію, нами виявлена протилежна тенденція змін щодо активності NADH-метгемоглобінредуктази. Як видно з даного рисунку введення токсичних доз медикаментозного ксенобіотику призводило до зниження активності даного ензиму в групі щурів ТУ порівняно із показниками контролю. Після проведення часткової резекції тканин печінки в даній групі тварин рівень нами зареєстровано посилене пригнічення досліджуваної ензиматичної активності (рис. 8). Це створює несприятливі умови для відновлення метгемоглобіну до гемоглобіну. Зазвичай НАДН-метгемоглобінредуктаза (НАДН-діафораза) відновлює пошкодження, викликані окисленням атома заліза в гемоглобіні. Дефіцит або відсутність цього ферменту призводить до метгемоглобінемії.

Наприклад, роль MetHb як маркера анемічного стресу також була підтверджена в дослідженні, що вивчає зміни MetHb у пацієнтів, які перенесли операцію на серці. У той час як «анемія запалення» пов'язана з метгемоглобінемією, залізодефіцитна анемія, здається, є додатковим фактором

ризик у набутої метгемоглобінемії через посилення окислювального стресу еритроцитів [69].

MetHb може мати прозапальні властивості. Наприклад, він активує шлях NF-κB в ендотеліальних клітинах, пов'язаний із виробництвом хемокіну (IL-8) та цитокіну (IL-6) [65], що узгоджується із попередніми дослідженнями наукової групи у тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном після ЧГ. Це підкреслює, що підвищення MetHb у крові впливає на виробництво цитокінів/хемокінів — факт, який може мати особливе значення при розвитку печінкової недостатності.

Наші результати свідчать про те, що метгемоглобін може бути маркером гострої анемії, а механізми, які генерують спричинене анемією утворення метгемоглобіну, можуть жорстко регулюватися, щоб запобігти виробленню наднормальних рівнів метгемоглобіну, що може ще більше погіршити доставку кисню до тканин.

Еритроцити можуть відчувати вищий рівень окисного стресу, що потенційно може призвести до накопичення метгемоглобіну та активних форм кисню, які можуть окислювати ендогенний гемоглобін до метгемоглобіну.

Отже, максимально підвищений рівень метгемоглобіну на тлі зниження активності НАДН-метгемоглобінредуктази на ранніх етапах регенерації (24 та 48 год) печінки може бути корисним для надання унікальної інформації про ступінь гіпоксії тканин, спричиненої анемією, у тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном.

ВИСНОВКИ

1. Після часткової резекції тканин печінки у щурів із токсичним ураженням зниження концентрації гемоглобіну та зменшення кількості еритроцитів відбувається впродовж усього регенеративного періоду із поглибленням стану анемії та еритропенії у фазу термінації (72 год) та віддалений період (168 год).
2. Відновлення тканин печінки після часткової гепатектомії у контрольних щурів характеризується незначною нормохромією внаслідок зниження середнього вмісту та концентрації гемоглобіну в еритроцитах на ранніх етапах регенерації з віддаленим ефектом макроцитозу. Часткова резекція печінки у тварин із токсичним ураженням супроводжується розвитком гіпохромної мікроцитарної анемії із посиленням на термінальних стадіях (72 та 168 год) регенераційного процесу.
3. У крові щурів із токсичним ураженням після часткової гепатектомії відбувається підвищення рівня карбоксигемоглобіну з максимальними значеннями на віддалених етапах регенерації печінки (72 та 168 год), що робить можливим використання даного показника як біомаркера розвитку гемічної гіпоксії після операційних утручань, викликаних гострою гепатотоксичністю.
4. Максимально підвищений рівень метгемоглобіну на тлі зниження активності НАДН-метгемоглобінредуктази на ранніх етапах регенерації (24 та 48 год) печінки може бути корисним для надання унікальної інформації про ступінь гіпоксії тканин, спричиненої анемією, у тварин із токсичним ураженням ацетамінофеном.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Yagi S., Hirata M., Miyachi Y., Uemoto S., Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *International journal of molecular sciences*. 2020. Vol. 21. № 21. P. 8414.
2. Michalopoulos G. K., Bhushan B. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 2021. Vol. 18. № 1. P. 40–55.
3. Cascio M., DeLoughery T. Anemia: Evaluation and Diagnostic Tests. *The Medical clinics of North America*. 2017. Vol. 101 № 2. P. 263-284.
4. May J. et al. Three neglected numbers in the CBC: The RDW, MPV, and NRBC count. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2019. Vol. 86. № 3. P. 167–172.
5. Hosseinpour M. et al. Comparison of the red blood cell indices based on accuracy, sensitivity, and specificity to predict one-year mortality in heart failure patients. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2022. Vol. 22. № 1. P. 532.
6. Nevzorova Y., Tolba R., Trautwein C., Liedtke C. Partial hepatectomy in mice. *Laboratory Animals*. 2015. Vol. 49. № 1. P. 81-88.
7. Fausto N., Campbell J. S., Riehle K. J. Liver regeneration. *Journal of Hepatology*. 2012. Vol. 57. №3. P. 692-694.
8. Gilgenkrantz H., Collin A. Understanding Liver Regeneration: From Mechanisms to Regenerative Medicine. *The American Journal of Pathology*. 2018. Vol. 188. № 6. P. 1316-1327.
9. Tao Y., Wang M., Chen E., Tang H. Liver regeneration: analysis of the main relevant signaling molecules. *Mediators inflame*. 2017. Vol. 2017. P. 4256352.
10. Kang L-I., Mars W., Michalopoulos G. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cells*. 2012. Vol. 1. № 4. P. 1261–1292.
11. Marshall K., He S., Zhong Z., Atkinson C., Tomlinson S. Dissecting the complement pathway in hepatic injury and regeneration with a novel protective strategy. *The Journal of experimental medicine*. 2014. Vol. 211. № 9. P. 1793–1805.

12. Tan C., Lai R., Wong W., Dan Y., Lim S., Ho H. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Research & Therapy*. 2014. Vol. 5. № 3. P. 76.
13. Hoffmann K., Nagel A., Tanabe K. Markers of liver regeneration—the role of growth factors and cytokines: a systematic review. *BMC*. 2020. Vol. 20. №1. P. 31.
14. Poisson J., Lemoine S., Boulanger C., Durand F., Moreau R., Valla D. et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2017. Vol. 66. № 1. P. 212–227.
15. Mei Y., Thevananther S. Endothelial nitric oxide synthase is a key mediator of hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2011. Vol. 54. № 5. P. 1777–1789.
16. Nath B., Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: Diverse roles in liver diseases. *Hepatology*. 2012. Vol. 55. № 2. P. 622–633.
17. Budnitz D., Lovegrove, M., Crosby A. Emergency department visits for overdoses of acetaminophen-containing products. *American journal of preventive medicine*. 2011. Vol. 40. № 6. P. 585–592.
18. Jaeschke H., Williams D., Ramachandran A., Bajt, M. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012. Vol. 32. № 1. P. 8–20.
19. Jaeschke H., McGill M. et al. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*. 2012. Vol. 44. № 1. P. 88-106.
20. Ramachandran A., Jaeschke H. Acetaminophen Hepatotoxicity. *Seminars in liver disease*. 2019. Vol. 39. № 2. P. 221-234.
21. Sui B., Wang R., Chen C. et al. Apoptotic Vesicular Metabolism Contributes to Organelle Assembly and Safeguards Liver Homeostasis and Regeneration. *Gastroenterology*. 2024. Vol. 167. № 2. P. 343-356.

22. Zimmermann H., Trautwein C., Tacke F. Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury. *Frontiers in physiology*. 2012. Vol. 3. P. 56.
- 23 Bhushan B., Apte U. Liver Regeneration after Acetaminophen Hepatotoxicity: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *The american journal of pathology*. 2019. Vol. 189. № 4. P. 719-729.
24. Ying SQ., Cao Y., Zhou ZK. et al. Hepatocyte-derived tissue extracellular vesicles safeguard liver regeneration and support regenerative therapy. *Journal of nanobiotechnology*. 2024. Vol. 22. № 1. P. 521.
25. Wilson M., Forsyth P., Whiteside J. Haemoglobinopathy and sickle cell disease, *Continuing education in anesthesia critical care, pain*. 2010. Vol. 10. № 1. P. 24-26.
26. Thomas C., Lumb A. Physiology of haemoglobin. *Continuing education in anaesthesia, critical care and pain*. 2012. Vol. 12. № 5. P. 251-256.
27. J-OC Dunn, MG Mythen, MP Grocott. Physiology of oxygen transport. *BJA Education*. 2016. Vol. 16. № 10. P. 341-348.
28. Gleixner E., Ripp F., Gorr T., Schuh R. et al. Knockdown of drosophila hemoglobin suggests a role in O₂ homeostasis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2016. Vol. 72. P. 20-30.
29. Thom S., Dickson C., Gell D., Weiss M. Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Vol. 3. № 3. P. a011858.
30. Schechter A. Hemoglobin function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012. Vol. 3 № 5. P. 101-112.
31. Carrola A., Romao C., Vieira H. Carboxyhemoglobin (COHb): Unavoidable Bystander or Protective Player ?. *Antioxidants*. 2023. Vol. 12. № 6. P. 1198.
32. Gaspar J., Velloso L. Hypoxia inducible factor as a central regulator of metabolism - implications for the development of obesity. *Frontiers in neuroscience*. 2018. Vol. 12. P. 813.
33. Ekizoglu S. Genetic basis and molecular diagnosis of hemoglobinopathies. *Comprehensive hematology and stem cell research*. 2024. Vol 1. № 8. P. 147-161.

34. Bhagavan N., Ha C-E. Hemoglobin. *Essentials of medical biochemistry*. 2015. Vol. 2. № 26. P. 489-509.
35. Benz E., Ebert B. Hemoglobin Variants Associated With Hemolytic Anemia, Altered Oxygen Affinity, and Methemoglobinemias. *Hematology*. 2018. Vol. 43. № 7. P. 608-615.
36. Jensen F., Karsten Nielsen K. Methemoglobin reductase activity in intact fish red blood cells. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. 2018. Vol. 216. P. 14-19.
37. McKenzie S., Williams L. Clinical Laboratory Hematology. *Pearson*. 2019. Vol. 1. № 4. P. 1250.
38. Ярценко О. Загальний аналіз крові: норма, розшифровка, таблиця. *Health day*. 2017. Режим доступу: https://healthday.in.ua/korisno-znati/zahalnii-analiz-krovi/#goog_rewarded
39. Стоянова В. Загальний аналіз крові – що входить, норма та розшифровка результатів. *Euro MD*. 2022. Режим доступу: https://euromd.com.ua/zagalnii-analiz-krovi-sho-vhodit-norma-ta-rozshifrovka-rezyltativ/#google_vignette
40. Гематологічні дослідження. *Студопедія*. Режим доступу: https://studopedia.com.ua/1_158799_gematologichni-doslidzhennya.html
41. MCH – Wert und Bedeutung. *Praktisch Arzt*. Режим доступу: <https://www.praktischarzt.de/untersuchungen/blutuntersuchung/blutwerte/mch-wert/>
42. Elghetany M., Banki K. Erythrocytic disorders. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 2022. Vol. 24. № 33. P. 588-635.
43. Gell D. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2018. Vol. 70. P. 13-42.
44. Assouline B. et al. Intravenous iron supplementation after liver surgery: Impact on anemia, iron, and hepcidin levels—a randomized controlled trial. *Surgery*. 2021. Vol. 170. №3. P. 813–821.

45. Nemeth E., Ganz T. Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. № 12. P. 6493.
46. Camaschella C., Nai A., Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. *Haematologica*. 2020. Vol. 105. № 2. P. 260–272.
47. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M. Blood erythrocyte indices in rats under conditions of acetaminophen-induced toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Medicni perspektivi*. 2022. Vol. 27. №2. P. 22-28.
48. Cazzola M. Ineffective erythropoiesis and its treatment. *Blood*. 2022. Vol. 139. № 16. P. 2460–2470.
49. Presley T., Bain L., Ballas S., Nichols J., Hernan Sabio, Gladwin M. et al. The Mechanism of Hemolysis in Sickle Cell Anemia. *Blood*. 2008. Vol. 112. № 11. P. 1439.
50. Erythrocyte Hemolysis: Mechanisms and Disease Implications. *BiologyInsights Team*. Режим доступу: <https://biologyinsights.com/erythrocyte-hemolysis-mechanisms-and-disease-implications/>
51. Еритроцитарні індекси. Режим доступу: <https://empendium.com/ua/manual/chapter/B72.VI.C.1.1.3>
52. Hsieh Y. et al. Mean Corpuscular Volume and Mortality in Patients with CKD. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2017. Vol. 12. № 2. P. 237–244.
53. Hindson J. Haemolysis and liver macrophages. *Nature reviews. Gastroenterology and Hepatology*. 2020. Vol. 17. № 11. P. 650.
54. Theisler C. Anemia (Macrocytic). *Adjuvant Medical Care*. 2022. Vol. 1. P.17–18.
55. Maner S., Killeen R., Moosavi L. Mean Corpuscular Volume. *StatPearls*. 2024. Режим доступу: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31424859/>
56. Копильчук Г., Николайчук І., Нікорич М. Маркери запалення у щурів за умов токсичного ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну. *Scientific*

Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems). 2023. Т. 15. № 2. С. 109-115.

57. Microcytic Anemia. *American Academy of Pediatrics*. 2024. Режим доступу: <https://doi.org/10.1542/9781610027847>

58. Березюк О. Етіопатогенетична структура гіпохромних анемій, диференційна діагностика, підходи до лікування. *Вісник Вінницького національного медичного університету*. 2017. Т.2. №2. С. 420–424.

59. Simbaqueba C. et al. Prognostic Implications of Relative Hypochromia in Ambulatory Patients With Chronic Systolic Heart Failure. *Congestive Heart Failure*. 2012. Vol. 19. №4. P. 180–185.

60. Pedersen M. et al. Hemoglobin adducts of acrylamide in human blood – What has been done and what is next?. *Food and Chemical Toxicology*. 2022. Vol. 161. P. 112799.

61. Lee G., Shaefi S., Otterbein L. HO-1 and CD39: It Takes Two to Protect the Realm. *Frontiers in Immunology*. *Frontiers in immunology*. 2019. Vol. 10. P. 1765.

62. D'Amico G. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *Journal of Cell Science*. 2006. Vol. 119. № 11. P. 2291–2298.

63. Hare T. et al. Anaemia: Can we define haemoglobin thresholds for impaired oxygen homeostasis and suggest new strategies for treatment? *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2013. Vol. 27. № 1. P. 85–98.

64. Tibi P. et al. STS/SCA/AmSECT/SABM Update to the Clinical Practice Guidelines on Patient Blood Management. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2021. Vol. 112. № 3. P. 981–1004.

65. Scholkmann F. et al. The Role of Methemoglobin and Carboxyhemoglobin in COVID-19: A Review. *Journal of Clinical Medicine*. 2020. Vol. 10. № 1. P. 50.

66. Hare G. et al. Is methemoglobin an inert bystander, biomarker or a mediator of oxidative stress–The example of anemia?. *Redox Biol*. 2013. Vol. 1. № 1. P.65–69.

67. Mistry N., Shehata N., Hare GMT. et al. Methemoglobin as a Marker of Acute Anemic Stress in Cardiac Surgery. *iScience*. 2023. Vol. 26. № 8. P. 107429.

68. Trivedi D. et al. Methemoglobinemia: Living with Dormant Devil. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2016. Vol. 32. № 2. P. 248–250.
69. Nagababu E. et al. Iron-deficiency anaemia enhances red blood cell oxidative stress. *Free Radical Research*. 2008. Vol. 42. № 9. P. 824–829.

ДОДАТКИ

Додаток А. Охорона праці та безпеки в надзвичайних ситуаціях

Вимоги безпеки під час виконання роботи

Поводитись зі скляним посудом потрібно обережно, щоб запобігти травм під час лабораторних робіт. Весь скляний посуд перед використанням для лабораторних експериментальних робіт потрібно очистити. Використаний скляний посуд необхідно промити водою. У разі великого забруднення скляного посуду потрібно занурити і витримати його у розчині хромової кислоти. Зазвичай використовуються скляні склянки, пробірки, конічні, об'ємні, мірні циліндри, піпетки, пляшки з реагентами тощо. Руки повинні бути захищеними латексними рукавичками.

Загальні запобіжні заходи для запобігання ураження електричним струмом у лабораторних приміщеннях:

1. У лабораторії все електрообладнання повинно бути належним чином заземлено.
2. Слід уникати ланцюгів перевантаження.
3. Електрообладнання не можна торкатися мокрими руками.
4. Не можна залишати обладнання увімкненим, коли воно не використовується.

Робочий простір має бути завжди охайним, а перед виходом із лабораторії все обладнання та прилади потрібно повернути на полицю. Після завершення Небажаний матеріал лабораторного експерименту необхідно викидати у призначені контейнери. У робочій зоні лабораторії повинна бути обов'язкова станція промивання очей, на випадок попадання хімікатів. Станції для промивання очей повинні мати дзеркало та набір пляшок із сольовим розчином, який можна використовувати для промивання ушкоджених очей водою. Станція промивання очей призначена для того, щоб було можливо промити очі безперервним потоком води.

Робоча зона повинна бути чистою. Все лабораторне обладнання має бути чистим перед використанням. Потрібно очистити обладнання робочої зони та

лабораторний посуд після використання. Робоча зона лабораторії повинна бути вільною від небажаних реагентів. Необхідно забезпечити належне зберігання хімікатів. Усі реагенти мають бути акуратно марковані. Не потрібно забруднювати реагенти, використовуючи використані/брудні піпетки для взяття реагенту. Потрібно використовувати стерильні шпателі, у разі твердих речовин, для виймання хімікату. Пробки пляшок з реагентами мають бути чистими. Пляшки з реагентами потрібно повернути на відповідну полицю відразу після використання, щоб уникнути випадкового розбиття пляшок на робочому столі. Тверді речовини потрібно викинути у сміттєві баки. Міцні кислоти або луги необхідно вилити в призначену для цього ємність.

Правила роботи з центрифугою. Перед початком роботи потрібно переконатися, що центрифуга стоїть на відповідній поверхні. Потрібно її збалансувати, щоб не призвести до поломки пристрою, або травмування оператора. Загальна маса кожної пробірки має бути якомога ближчою. Бажано балансувати маси з точністю до 0,1 грама, і важливо балансувати пробірки за масою, а не за об'ємом. Під час роботи захисна кришка має бути закритою. Якщо центрифуга коливається або тремтить, потрібно витягнути вилку з джерела живлення. Невелика вібрація є нормальною, але надмірна кількість може означати небезпеку.

Правила роботи з фотоелектроколориметром. Він потребує початкового калібрування з використанням стандартних розчинів із заданою концентрацією розчиненої речовини, яка має бути виміряна в досліджуваному зразку. Перед початком процедури потрібно підготувати досліджувані речовини, увімкнути прилад за 10-15 хвилин та дати йому прогрітись перед початком роботи. Вибираємо правильний фільтр та відповідний режим, тобто % пропускання або поглинання. Після чого вставляємо кювету з контрольним розчином та анулюємо прилад. Фіксуємо значення контрольної проби та порівняно з нею отримуємо значення оптичної щільності дослідних зразків.