МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
кафедра біохімії та біотехнології

ТРОМБОЦИТАРНІ ІНДЕКСИ У ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ ПРОТЕЇНУ ТА ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ АЦЕТАМІНОФЕНОМ

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконав:
студент 6 курсу, 600 М групи
Сандуляк Андрій Віталійович
Керівник:
кандидат біологічних наук,
асистент **Николайчук І.М.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол №____від _____ 2023 р.
Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2023

Анотація

Магістерська робота присвячена дослідженню показників тромбоцитарно-судинної ланки системи гемостазу щурів за умов аліментарної недостатності протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження. За даних експериментальних умов у крові щурів визначено: кількісний вміст тромбоцитів, середній об'єм тромбоцитів, ширину розподілу тромбоцитів, тромбокрит та концентрацію D-димеру.

Встановлено, що ацетамінофен-індуковане ураження виступає ключовим чинником зниження кількості тромбоцитів у крові та тромбокриту, зростанням їх середнього об'єму з одночасним збільшенням ширини розподілу за наявності гігантських тромбоцитарних скупчень.

Аліментарна депривація протеїну посилює процес надмірного тромбоутворення за умов токсичного ураження ацетамінофеном, що характеризується максимальним підвищенням рівня D-димеру за даних експериментальних умов.

Ключові слова: *тромбоцити, тромбокрит, середній об'єм тромбоцитів, ширина розподілу тромбоцитів, D-димер, гемостаз, низькопротеїновий раціон, ацетамінофен*

Annotation

The master's thesis is dedicated to the investigation of indicators of the platelet-vascular lining system, hemostasis of the eyes, and nutritional deficiency of protein and acetaminophen-induced low blood pressure. According to the data of experimental minds, the following values were determined in the blood of the Schurs: platelet volume, average platelet volume, platelet width, thrombocrit and D-dimer concentration.

It has been established that acetaminophen-induced levels are the key cause of a decrease in the number of platelets in the blood and thrombocrit, an increase in their average volume with a sudden increase in the width of the division due to the appearance of giant platelet avarice.

Alimentary protein deprivation enhances the process of over-the-counter thrombus formation for the toxic levels of acetaminophen, which is characterized by maximum increases in the level of D-dimer in these experimental minds.

Key words: *platelets, thrombocrit, average platelet volume, platelet cross section width, D-dimer, hemostasis, low protein diet, acetaminophen*

ЗМІСТ

ВСТУП……5

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ……7

1.1. Тромбоцити та їх біологічна роль……..7

1.2. Основні механізми утворення тромбоцитів.....9

1.3. Сучасні механізми гемостазу та тромбозу……11

1.4. Тромбоцити та ендотеліальні клітини……..14

1.5. Роль рецепторів у взаємодії тромбоцитів з імунними клітинами……..15

1.6. Фактори росту, що виділяються тромбоцитами……..…17

1.7. Антитромбоцитарна терапія та комплексна функція тромбоцитів……20

1.8. D-димер та його біологічна роль……21

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ……..…24

2.1. Об’єкти та матеріали досліджень……..24

2.2. Спосіб приготування, фіксації та фарбування мазків крові …….....25

2.3. Дослідження кількісного вмісту тромбоцитів…….27

2.4. Оцінка середнього об’єму, ширини розподілу тромбоцитів та тромбокриту……..28

2.5. Визначення рівня D-димеру……...28

2.6. Статистична обробка експериментальних даних……29

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ……30

ВИСНОВКИ……41

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……..……..42

ДОДАТКИ……49

ВСТУП

Тромбоцити відіграють ключову роль у гемостазі. Сучасна література свідчить про те, що порушення функції тромбоцитів може мати важливе значення при тромбоцитопенії або тромбоцитозі, що нерідко призводить до виникнення кровотеч або ж розвитку тромбозу [1].

Тромбоцити є первинними клітинними медіаторами гемостазу і ця функція забезпечує їх участь у різноманітних запальних процесах. Наприклад, тромбоцити можуть діяти як циркулюючі медіатори, експресуючи Toll-подібні рецептори (TLR), які зв'язують патогени, і це дозволяє тромбоцитам ефективно вбивати їх або представляти клітинам імунної системи. Окрім того, активовані тромбоцити виділяють і експресують багато про- і протизапальних молекул, які приваблюють і захоплюють циркулюючі лейкоцити і направляють їх до запалених тканин [2].

Водночас тромбоцити можуть безпосередньо впливати на адаптивні імунні відповіді через секрецію, наприклад, молекул CD40 і CD40L. Тромбоцити також є джерелом більшості мікровезикул у системі кровообігу, і ці мізерні елементи ще більше посилюють здатність тромбоцитів взаємодіяти з імунною системою [3].

Нещодавно продемонстровано, що тромбоцити та їхні батьківські клітини – мегакаріоцити (МК), також можуть поглинати, обробляти та презентувати як чужорідні, так і власні антигени CD8+ Т-клітинам, надаючи їм здатність безпосередньо змінювати адаптивні імунні відповіді [4].

Гемостаз є критично важливим процесом, який діє для регуляції порушень у судинній системі. Це забезпечує дві основні функції: запобігає подальшій крововтраті та перешкоджає доступу патогенів до судинної системи. Тромбоцити є ключовими посередниками цієї відповіді, вони зупиняють крововитік і сприяють загоєнню ран. Окрім того, тромбоцити відіграють ключову роль у запобіганні інфекції. При активації тромбоцити виділяють вміст своїх гранул, які, як відомо, містять понад 300 білків [5], а також біоактивні молекули, зокрема АДФ і серотонін. АДФ діє, щоб залучати більше

тромбоцитів до наростаючого тромбу, тоді як серотонін викликає звуження судин, щоб зменшити крововтрату. Секретовані цитокіни та хемокіни залучають лейкоцити для боротьби з будь-якою потенційною інфекцією, а секретовані антимікробні пептиди діють, щоб знищити патогени [6].

Припущення про те, що тромбоцити беруть участь лише в первинному гемостазі та регуляції кровоплину, давно було поставлене під сумнів, і зараз є докази того, що ці клітинні фрагменти відіграють особливу роль в імунній відповіді [7]. Це передбачає зв'язок між вродженим і адаптивним імунітетом, тому тромбоцити беруть участь не лише в першому захисті від чужорідних антигенів, але й задіяні у функціонуванні імунної відповіді у набагато комплекснішій моделі. Через ліганд CD40 (CD40L), опосередковуючи взаємодію з CD40 на В-клітинах, дендритних клітинах і макрофагах, вони здатні представляти чужорідні патогени та молекули Т-клітинам, що підтверджує гіпотезу про участь тромбоцитів принаймні у вродженому імунітеті [8]. Крім того, тромбоцити демонструють рецептори Fcγ імуноглобуліну G (FcγR), і всі дев'ять Toll-подібних рецепторів (TLR), описаних у людини, є на тромбоцитах [9].

Наприклад, опосередкована ліпополісахаридом (LPS) індукція TLR4 може сприяти утворенню тромбоцитарно-нейтрофільних агрегатів, де тромбоцити відіграють роль індукторів позаклітинних пасток нейтрофілів (NET). NET складаються з мережі гістонів, хроматину та ферментів деградації, що вивільняються нейтрофілами під час унікального типу клітинної смерті (NETosis), і їх основною метою є захоплення та елімінація патогенів за допомогою окисних і неокисних механізмів, таким чином обмежуючи їх дифузію в кровотік [10].

Враховуючи наведені вище факти, метою роботи стало дослідження показників тромбоцитарно-судинної ланки системи гемостазу щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Тромбоцити та їх біологічна роль

Тромбоцити — це невеликі фрагменти без'ядерних клітин, які мають характерну дископодібну форму та діаметр від 1 до 3 мкм. Історично тромбоцити називали клітинним пилом. Але тепер ми знаємо, що вони незамінні для таких процесів, як гемостаз, загоєння ран, ангіогенез, запалення та вроджений імунітет.

Тромбоцити утворюються з цитоплазми мегакаріоцитів (МК), їхніх клітин-попередників, які знаходяться в кістковому мозку. МК є найбільшими (50–100 мкм), а також одними з найрідкісніших клітин кісткового мозку; МК становлять ~ 0,01% ядерних клітин кісткового мозку. Щоб зібрати та вивільнити тромбоцити, МК стають поліплоїдними шляхом ендомітозу (реплікації ДНК без поділу клітин), а потім проходять процес дозрівання, під час якого основна частина їхньої цитоплазми упаковується в кілька довгих відростків, які називаються протромбоцитами, а ядро екструдується. МК може поширюватися на 10–20 пластинок, кожна з яких починається як тупий виступ, який з часом подовжується, стоншується та неодноразово розгалужується. Тромбоцити вибірково утворюються на кінчиках протромбоцитів. Коли тромбоцити розвиваються, вони отримують вміст гранул і органел у вигляді потоків окремих частинок, що транспортуються з тіла клітини МК [11].

Формування тромбоцитів можна умовно розділити на дві фази: перша фаза дозрівання та розвитку МК займає кілька днів, щоб завершитися, і вимагає специфічних для МК факторів росту. Протягом цього часу відбувається масивна ядерна проліферація та збільшення цитоплазми МК, оскільки МК заповнюється білками цитоскелета, специфічними для тромбоцитів гранулами та достатньою кількістю мембрани для завершення процесу складання тромбоцитів. Другий етап є відносно швидким і може бути завершений протягом годин. Під час цієї фази МК генерують тромбоцити шляхом реконструкції їхньої цитоплазми спочатку в протромбоцити, а потім у претромбоцити, які піддаються наступним подіям поділу для генерації

дискоїдних тромбоцитів. Час, необхідний МК для завершення поліплоїдізації, дозрівання та вивільнення тромбоцитів, становить ~5 днів у людей і 2–3 дні у гризунів. Після потрапляння в кров тромбоцити людини живуть 7–10 днів, тоді як тромбоцити гризунів живуть 4–5 днів [12].

Тромбоцити є другими за чисельністю в кровоплині (150–400 × 10^9/л), вони можуть вбивати патогени за допомогою інкапсуляції та антимікробних пептидів. Наприклад, тромбоцити здатні безпосередньо зв'язуватися з патогенними мікроорганізмами шляхом експресії асоційованого з патогеном молекулярного шаблону (PAMP), що таким чином опосередковує протиінфекційний імунітет. Також зрозуміло, що тромбоцити викликають декілька негемостатичних імунних функцій а, отже, добре розташовані, щоб швидко реагувати на пошкодження судин і залучати лейкоцити до місць пошкодження [13].

Невідомо, як тромбоцити виконують всі свої різні імунні функції. Одна теорія припускає еволюційний зв'язок між тромбоцитами та гемоцитами безхребетних, які не лише захищають членистоногих від патогенів, але й згортають гемолімфу в місцях пошкодження зовнішнього скелета; можливо, розбіжність сталася під час еволюції тромбоцитів, коли вони зберегли деякі імунні властивості гемоцитів. З іншого боку, все більше доказів свідчить про те, що тромбоцити можуть набувати своїх імунних властивостей від МК [14]. Наприклад, емпериполез — це рідкісне явище, коли непошкоджена клітина знаходиться в цитоплазмі іншої клітини. Кунін та ін. продемонстрували, що нейтрофіли можуть проникати в цитоплазму МК у зв'язаних мембраною везикулах і, опинившись у МК, вони переносять частини своєї мембрани до МК, а потім до тромбоцитів. Цей процес призводить до того, що циркулюючі тромбоцити несуть мембрани з донорських клітин, що не є МК, і це, можливо, посилює імунну функцію тромбоцитів [15].

Зараз очевидно, що тромбоцити відіграють ключову роль, пов'язуючи запалення, імунітет і цілісність судин, а також модулюють імунологічні процеси.

1.2. Основні механізми утворення тромбоцитів

МК розвиваються з гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), які знаходяться переважно в кістковому мозку, але також присутні в жовтковому мішку, печінці плоду та селезінці на ранніх стадіях розвитку. Під час дозрівання МК збільшуються в розмірі, наповнюються специфічними для тромбоцитів гранулами, розширюють цитоплазматичний вміст цитоскелетних білків і розвивають дуже звивисту інвагіновану мембранну систему [16].

Відкриття тромбопоетину та його МК-специфічного рецептора c-Mpl зробило революцію в галузі МК і біології тромбоцитів. Тромбопоетин функціонує як основний регулятор, який сприяє росту та розвитку МК з їхніх попередників HSC. Згодом це відкриття сприяло розробці систем клітинної культури *in vitro*, які відновлюють диференціацію, дозрівання МК, розширення протромбоцитів і виробництво тромбоцитів, і дозволило вивчити механізми, які регулюють ці процеси.

Ендомітоз — це в основному керований тромбопоетином процес, за допомогою якого МК стають поліплоїдними через цикли реплікації ДНК без поділу клітин (цитокінез). Вивченню ендомітозу значною мірою сприяло впровадження систем культивування *in vitro* з використанням тромбопоетину. Протягом свого життєвого циклу МК спочатку проходять проліферативну стадію 2n, на якій їх прогресування через клітинний цикл є ідентичним до інших гемопоетичних клітин. Згодом МК починають ендомітоз і накопичують вміст ДНК 4n, 8n, 16n, 32n, 64n і навіть 128n в одному полілобульованому ядрі перед тим, як продовжити своє остаточне дозрівання та утворення протромбоцитів [17].

Існує теорія, що МК є поліплоїдними, щоб виробляти велику кількість мРНК і білка, необхідних для упаковки в тромбоцити, зберігаючи при цьому свою здатність виконувати численні функції без стресу мітозу та цитокінезу. Хоча ендомітоз і поліплоїдизація, безсумнівно, важливі для цитоплазматичного дозрівання МК, зв’язок між високим вмістом ядерної ДНК і ефективним утворенням тромбоцитів все ще є предметом дискусій.

Наприклад, нікотинамід, форма вітаміну B_3, зазвичай використовується для підвищення плоїдності МК людини та миші в культурі. Хоча нікотинамід дійсно збільшує плоїдність, його вплив на утворення тромбоцитів є суперечливим. Деякі спостерігали індуковане нікотинамідом збільшення виробництва протромбоцитів *in vitro*, тоді як інші спостерігали зменшення утворення протромбоцитів [18].

Протромбоцити, які функціонують як складальні лінії для виробництва тромбоцитів, складаються з здуття розміром з тромбоцит у тандемних масивах, які з'єднані тонкими цитоплазматичними містками. Продукцію протромбоцитів спостерігали *in vivo* шляхом візуалізації протромбоцитів, що простягаються в синусоїдальні кровоносні судини кісткового мозку.

Що відбувається, коли протромбоцити потрапляють у кровоплин? У світлі останніх досліджень виявилося, що МК вивільняють гетерогенну суміш у кров, що вказує на те, що кінцеве утворення тромбоцитів може тривати в кровоплині. Наявність протромбоцитоподібних структур у крові визнано давно, і тому ймовірно, що протромбоцити регулярно фрагментуються з тіла МК, потрапляють у кров і дозрівають у тромбоцити під час циркуляції. Schwertz та ін. (2010) показали, що тромбоцити здатні виробляти потомство; тромбоцити утворюють штангоподібні структури «фігури 8» з двома колбами розміром з тромбоцити на кожному кінці, які містять власні органели та цитоскелетну систему. Це подвоєння відбувається *in vitro* протягом кількох годин, залежить від непошкодженої мікротубулярної мережі та пов'язане зі збільшенням синтезу білка. Згодом Thon et al. (2010) відзначив, що претромбоцити — це без'ядерні дископодібні частинки діаметром 2–10 мкм, які можуть оборотно перетворюватися на протромбоцити. Як у дослідженні Schwertz та ін. (2010), Thon et al. (2012) виявили, що претромбоцити здатні дозрівати в тромбоцити як *in vitro*, так і після переливання мишам *in vivo*. Крім того, було виявлено, що це процес, опосередкований мікротрубочками; двонаправлена полімеризація мікротрубочок на кожному кінці пропластинки

творює дві спілки мікротрубочок розміром із пластинку (діаметр 2 мкм) на кожному кінці, які розщеплюються на дві окремі пластинки після події [19].

1.3. Сучасні механізми гемостазу та тромбозу

Достовірно встановлено, що при первинному гемостазі тромбоцити прилипають до пошкодженої стінки судини в місці пошкодження. Цей процес відбувається через численні сигнальні каскади та сильно залежить від глікопротеїнів (GP), які експресуються на поверхні тромбоцитів. Інгібіторна функція інтактного ендотелію (зокрема, вироблення простацикліну та оксиду азоту, а також експресія CD39) знижується після пошкодження судини, і білки позаклітинного матриксу, такі як колаген, піддаються циркуляції [20].

Адгезія тромбоцитів або початкове зв’язування тромбоцитів з пошкодженим місцем відрізняється залежно від рівня напруги зсуву в кровоплині. При високій напрузі зсуву циркулюючий плазмовий фактор фон Віллебранда (vWF) швидко розгортається та відкладається на відкритому субендотеліальному колагені в місці пошкодження. Розгортання vWF відкриває кілька сайтів зв’язування GP1b (CD42). Цей процес зменшує швидкість тромбоцитів, що забезпечує низьку напругу зсуву та взаємодію GPVI та колагену. При низькій напрузі зсуву тромбоцити прилипають переважно до колагену через свої інтегрини GP1a/2a. Ця фаза адгезії призводить до активації тромбоцитів, а також ряду чітких фізіологічних і цитоскелетних змін тромбоцитів, включаючи перехід від дископодібної форми спокою до активованого стану з численними псевдоподіями [21].

Початкова адгезія та активація тромбоцитів супроводжуються залученням додаткових тромбоцитів із кровообігу та утворенням тривимірних агрегатів через низку молекулярних взаємодій. Залучення інших тромбоцитів, їх активація та агрегація тромбоцитів опосередковані тромбоцитарним утворенням тромбоксану А2 (ТхА2) і вивільненням АДФ з їхніх δ-гранул. Взаємодія тромбоцитів під час утворення тромбів додатково

опосередковується та стабілізується рецептором фібриногену тромбоцитів GP2b/3a.

Залежно від рівня пошкодження, кров може просочуватися в тканини та піддавати тромбоцити впливу тканинного фактора, що експресується клітинами, що складають судину. Наявність тканинного фактора призводить до утворення тромбіну, який опосередковує агрегацію тромбоцитів. Після формування первинна гемостатична пробка втягується і міцно закріплюється на місці пошкодження, запобігаючи повторній кровотечі. Стабілізація тромбу описується як вторинний гемостаз і характеризується консолідацією тромбоцитарної маси через ретракцію тромбоцитів, опосередковану актином/міозином. На цьому етапі тромбін, крім активації тромбоцитів, перетворює фібриноген у фібрин, що призводить до утворення мережі фібринових волокон. У певних умовах нормальний гемостаз порушується патологічними факторами, що призводить до неконтрольованого утворення тромбу та потенційної оклюзії судини. Неконтрольоване утворення тромбу визначається як тромбоз і в артерії головним чином опосередковується тромбоцитами. Артеріальний тромбоз є основною причиною інфаркту міокарда та інсульту (емболічного або *in situ*), тоді як утворення венозного тромбу може призвести до тромбозу глибоких вен та/або венозної тромбоемболія (ВТЕ) [22].

У відповідь на патогени, що передаються через кров, і подальше пошкодження тканин, тромбоцити також беруть участь у скоординованій відповіді внутрішньосудинної коагуляції, нещодавно названій «імунотромбозом». Під час цього процесу тромбоцити та імунні клітини утворюють фізичний бар’єр обмеження, що запобігає поширенню патогенів і потенційно призводить до активації вроджених і адаптивних гілок імунної системи. Цікаво, що тромбоцити опосередковують взаємодію між гемостатиком та імунною системою, використовуючи подібні шляхи. Встановлено, що різні вірусні чи бактеріальні інфекції сприяють ризику тромбозу, який проявляється як артеріальний тромбоз або ВТЕ, і можуть

сприяти атеросклерозу. Таким чином, хоча імунотромбоз може бути ефективним способом допомоги імунній системі, він може значно посилювати загальний ризик серцево-судинних захворювань [23].

Недавні дослідження *in vivo* надали більш комплексне уявлення про гемостаз і тромбоз. Ця нова модель передбачає, що гемостатична пробка характеризується суворою архітектурою з чітким ядром і зовнішньою оболонкою. Відкладення фібрину чітко локалізується біля основи ядра в позасудинному просторі до досягнення повного гемостазу. Також встановлено градієнт активації тромбоцитів, при цьому внутрішня серцевина пробки складається з щільно упакованих активованих тромбоцитів, які дегранульовані та позитивні на Р-селектин, тоді як зовнішня оболонка складається з менш активованих нещільно упакованих тромбоцитів, які не експресують Р-селектин. Зовнішня оболонка, однак, стабільна і проникна для розчинених речовин плазми. Відповідно до градієнта активації розподілу тромбоцитів, існує чіткий розподіл агоністів тромбоцитів у тромбі. Ядро пробки містить високу концентрацію тромбіну, і, оскільки пробка стає більш пористою, розвивається градієнт АДФ і ТхА2 [24].

Пориста зовнішня оболонка тромбу може сприяти рекрутуванню лейкоцитів, необхідних для відновлення травми або усунення збудника. У місці пошкодження у венах (низька напруга зсуву), крім активації тромбоцитів і утворення тромбу, тромбін відіграє центральну роль у залученні лейкоцитів до гемостатичної пробки. Цей процес опосередковується переважно активованими тромбоцитами, а не ендотеліальними клітинами. Активація/розщеплення рецептора тромбіну PAR4 тромбоцитів сприяє залученню та міграції лейкоцитів, а Р-селектин тромбоцитів забезпечує взаємодію лейкоцитів із тромбом. Тромбін також бере участь у виробленні фібрину, який обмежує міграцію лейкоцитів у згустку, утворюючи фізичний бар’єр. Нарешті, тромбоцитарний GP1b може зв’язувати тромбін, зменшуючи його дію та обмежуючи надходження лейкоцитів у тромб [25].

За умов нижчого напруження зсуву у венах або артеріях (реперфузія ішемії) адгезивні взаємодії тромбоцитів також можуть призвести до утворення хемотаксичного градієнта CXCL7 у тілі тромбу. Цей градієнт керує внутрішньосудинною міграцією лейкоцитів через тромби до місць ушкодження через їхні рецептори CXCR1/216. Це свідчить про те, що тромбоцити, опосередковуючи гемостаз, також можуть сприяти рекрутуванню лейкоцитів у тромб, уможливлюючи тісний контакт імунної системи з потенційними патогенами, які могли проникнути через шкірний бар'єр. Необхідні подальші дослідження, щоб з'ясувати, як змінюється розподіл тромбоцитів *in vivo* у венозних тромбах, пов'язаних із патогенами.

1.4. Тромбоцити та ендотеліальні клітини

Ендотеліальні клітини також регулюють активацію тромбоцитів і розмір тромбу шляхом секреції тромборегуляторів, таких як оксид азоту (NO) та простацикліни, і видалення АДФ/АТФ через CD39-ектонуклеотидазу. NO також може секретуватися тромбоцитами та пригнічувати додаткове залучення тромбоцитів, знижувати експресію P-селектину та сприяти дезагрегації [26].

За відсутності додаткових сигналів тромбоцити від'єднуються і повертаються в кровообіг. Коли ендотелій перебуває під напругою, міцна адгезія тромбоцитів відбуватиметься через ендотеліальний ICAM1 (або через ендотеліальний αVβ3) і тромбоцитарний GP2b/3a залежно від фібриногену. Ендотеліальний стрес проявляється під час запалення або інфекції збільшенням поверхневої експресії P-селектину, E-селектину, VCAM та ICAM-118. За вищої напруги зсуву в малих венулах ендотеліальний P-селектин і тромбоцитарний PSGL1 або GP1bα опосередковують рух тромбоцитів. Перекочування тромбоцитів по інтактному ендотелію спостерігається переважно у венах і збільшується з активацією ендотелію у відповідь на запальний стимул або інфекцію. За низької напруги зсуву у венах

тромбоцитарно-ендотеліальна взаємодія опосередковується тромбоцитарним GP1bα та ендотеліальним vWF

Крім поверхневої експресії інтегрину/селектину, тромбоцити також можуть впливати на ендотелій, збільшуючи поверхневу експресію CD154 (CD40L) або секретуючи цитокіни, такі як IL-1β. Через кілька секунд після стимуляції тромбіном тромбоцитів людини *in vitro* відбувається поверхнева експресія CD154. Тромбоцит CD154, у свою чергу, може призвести до експресії ендотеліального E-селектину, VCAM1 та ICAM1, а також секреції MCP1 та IL-8 з ендотеліальних клітин. Окрім поверхневої експресії білка, тромбоцити можуть синтезувати білки із збережених матриць РНК [27].

Один із цих білків, цитокін IL-1β, синтезується у відповідь на запальні подразники. Вивільнений IL-1β може збільшити проникність ендотелію, а також залучення та прикріплення лейкоцитів до ендотелію. Це призводить до зміни тромбоцитів трансміграції запальних клітин до пошкодженої або інфікованої тканини. Цікаво, що IL-1β підвищує потенціал зв'язування тромбоцитів з колагеном і фібриногеном і, у присутності колагену, сприяє агрегації [28].

1.5. Роль рецепторів у взаємодії тромбоцитів з імунними клітинами

Щоб зрозуміти роль тромбоцитів у тромбозі в різних клінічних ситуаціях, слід розглянути їхню роль в імунітеті. За певних інфекційних станів або запальних подразників тромбоцити безпосередньо взаємодіють з циркулюючими лейкоцитами шляхом зміни поверхневої експресії P-селектину або CD405. P-селектин тромбоцитів і CD40 розпізнаються лейкоцитами PSGL1 і CD154 відповідно, що призводить до утворення тромбоцитарно-лейкоцитарних агрегатів. Тромбоцити утворюють ці агрегати переважно з циркулюючими моноцитами або нейтрофілами, тим самим сприяючи вродженій імунній відповіді. Тромбоцити також сприяють адаптивному імунітету шляхом взаємодії та активації дендритних клітин (ДК)

через вісь CD40-CD154. Опосередкована тромбоцитами активація ДК змушує ДК презентувати антиген Т-клітинам. Крім того, активація тромбоцитів також може призвести до вивільнення вмісту δ-гранул і секреції таких молекул, як серотонін і RANTES (CCL5), які, як відомо, також опосередковують активацію та диференціювання Т-клітин. Зокрема, тромбоцити містять транскрипти мРНК для всіх Toll-подібних рецепторів (TLR1-TLR10) [29].

TLR – це пов'язані з патогеном молекулярні рецептори розпізнавання, які є ключовими регуляторами в ініціації вродженої імунної відповіді на чужорідні організми. Тромбоцити експресують функціональний TLR4, TLR2 та TLR9, і ці TLR можуть ініціювати тромботичні реакції різної інтенсивності. Тромбоцити-TLR4 і -TLR2 також можуть опосередковувати взаємодію з нейтрофілами. Крім того, тромбоцити експресують функціональні TLR7 та TLR3. Експресія TLR у тромбоцитах у жінок пов'язана зі збільшенням P-селектину в плазмі, тоді як у чоловіків експресія TLR пов'язана зі збільшенням IL-6, TNFRII та розчинного ICAM-1 [30].

Цікаво, що аналіз тромбоцитів у 1864 осіб показує, що у жінок експресія всіх TLR значно вище, ніж у чоловіків. Стимуляція TLR3 не призводить до поверхневої експресії P-селектину або CD154, але при високій концентрації агоніста (можливо, еквівалентній пізнім стадіям інфекції) посилює агрегацію, опосередковану арахідоновою кислотою, АДФ або колагеном), а натомість змінюють взаємодію тромбоцитів і лейкоцитів. Стимуляція TLR7 призводить до поверхневої експресії P-селектину та CD154 на поверхні тромбоцитів, що свідчить про виділення α-гранул; однак ці TLR не індукують протромботичні відповіді (агрегацію, опосередковану тромбіном) [31].

Важливо, що імунна активація тромбоцитів відрізняється від гемостатичної, опосередкованої тромбіном реакції тромбоцитів. Гемостатична функція тромбоцитів, продемонстрована стимуляцією тромбіном, призводить до повного зникнення дископодібної форми тромбоцитів і перетворення їх на довгі переплетені «спагетті-подібні» псевдоподії. Імунна функція тромбоцитів, продемонстрована стимуляцією агоністом TLR7 або вірусом, що

активує TLR7, призводить до менших груп тромбоцитів, у яких окремі тромбоцити можна ідентифікувати з меншою кількістю псевдоподій, що з'єднуються з іншими тромбоцитами або лейкоцитами. Це свідчить про те, що тромбоцити зазнають різних форм активації залежно від стимулюючого сигналу та їх функціональної ролі. Для правильного утворення гемостатичної пробки або залучення лейкоцитів необхідні різні рівні активації.

Взаємодія тромбоцитів з нейтрофілами є центральною для ініціації імунної відповіді. У людини нейтрофіли є найпоширенішими лейкоцитами крові і разом з моноцитами є основними ініціаторами вродженої імунної відповіді. Тромбоцити утворюють гетеротипові агрегати з нейтрофілами внаслідок активації TLR7, TLR2 і TLR4 у кровоплині [32].

Взаємодія тромбоцитів і нейтрофілів опосередковується віссю PSGL1 тромбоцитів P-селектин/нейтрофіл. Нейтрофіли також можуть фагоцитувати активовані тромбоцити *in vivo* з інтерналізацією, опосередкованою поверхневою експресією тромбоцитів фосфатидилсерину. Цікаво, що в результаті стимуляції TLR7 компоненти тромбоцитів (за визначенням CD41) інтерналізуються нейтрофілами. Наразі неясно, чи мікрочастинки тромбоцитів чи весь тромбоцит інтерналізуються як функція TLR7-стимуляції40 [33].

Взаємодія тромбоцитів і нейтрофілів також важлива для формування позаклітинної пастки нейтрофілів (NET), процесу, який називається нетозом, у результаті якого патогени захоплюються та нейтралізуються. *Staphylococcus aureus* альфа-токсин, наприклад, опосередковує секрецію β-дефензину 1 з тромбоцитів, що може призвести до утворення NET48. В умовах активації TLR4 ліпополісахаридом (LPS) тромбоцити сприяють нетозу, скорочуючи час, необхідний для утворення NET. Хоча різні TLR беруть участь у нетозі органів, роль тромбоцитарних TLR, за винятком TLR4, не була з'ясована [34].

1.6. Фактори росту, що виділяються тромбоцитами

Самі тромбоцити володіють терапевтичними властивостями, які використовуються в останні роки, особливо в галузі регенеративної медицини,

та демонструють багатообіцяючий потенціал у майбутньому. Крім того, збільшення тривалості життя призвело до зростання старіння населення в останні кілька десятиліть, а хронічні розлади стали все більш і більш поширеними, тому регенеративний потенціал тромбоцитів і похідних тромбоцитів почав досліджуватися глибше.

Тромбоцитарні гранули є потужним джерелом тромбоцитарних факторів росту (PGF), починаючи від більш специфічних для тромбоцитів молекул і закінчуючи біологічно активними медіаторами, якими користуються інші клітини, залучені в регенеративний каскад (ендотеліальні клітини, макрофаги, нейтрофіли та фібробласти). Їхня дія опосередковується взаємодією з рецепторами тирозинкінази та подальшою активацією багатофункціональних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів. Коротко їх функції можна підсумувати в чотирьох категоріях:

- ✓ мітогенез і клітинна диференціація;
- ✓ хемотаксис і міграція з важливими наслідками в ангіогенезі та реепітелізації;
- ✓ регуляція запальної відповіді;
- ✓ формування та ремоделювання позаклітинного матриксу [35].

З огляду на ці передумови, не дивно, що переливання крові та регенеративна медицина дійшли згоди, яка характеризується появою гемокомпонентів, «не для переливання», таких як концентрати тромбоцитів (ПК), які використовують властивості того, що називають «секретомом» тромбоцитів [36].

На додаток до описаних гемостатичних і запальних реакцій, активація тромбоцитів також призводить до утворення мікрочастинок. Це особливо важливе спостереження, оскільки тромбоцити є основним джерелом мікрочастинок у кровоплині. Білки, які опосередковують функцію тромбоцитів, пов'язану з гемостазом або імунітетом, також містяться в мікрочастинках тромбоцитів. Це включає молекули адгезії, такі як P-селектин, хемокіни, такі як RANTES, і цитокіни, такі як IL-1β. Мікрочастинки

тромбоцитів можуть сприяти залученню моноцитів до запаленого ендотелію атеросклеротичної бляшки. Збільшення циркулюючих мікрочастинок тромбоцитів було пов’язане з розвитком атеросклерозу у хворих на діабет. Такі інфекції, як грип або денге, також призводять до збільшення виділення мікрочастинок тромбоцитів. Під час ушкодження судин мікрочастинки тромбоцитів можуть збільшувати регенеративний потенціал ендотеліальних клітин-попередників шляхом посилення їх залучення, диференціювання та вивільнення проангіогенних факторів [36].

Окрім білків, мікрочастинки тромбоцитів містять різні форми РНК, у тому числі мікроРНК (міРНК), які є невеликими некодуючими РНК, які функціонують у посттранскрипційній регуляції експресії генів. Тромбоцити можуть впливати на навколишні клітини шляхом перенесення мікроРНК. міРНК тромбоцитів, miR-223 або miR-320b, присутні в мікрочастинках тромбоцитів після стимуляції тромбіном і можуть переходити в ендотеліальні клітини. Показано, що функціонально перенесення мікроРНК-320b в ендотеліальні клітини може зменшити експресію ICAM1. Подібним чином мікроРНК-126-3p, яка посилено експресується в тромбоцитах, може поглинатися та збагачуватися макрофагами, що призводить до підвищення фагоцитарного фенотипу [37].

Таким чином, тромбоцити демонструють складну взаємодію з циркулюючими клітинами та стінкою судин під час широкого спектру запальних процесів, які проявляються у багатьох типах захворювань. Однак гемостатична і запальна роль тромбоцитів збігається. Наприклад, тромбоцити можуть залучати лейкоцити та імунну систему, використовуючи білки, що беруть участь у формуванні гемостатичної пробки. Останні дані свідчать про те, що ці взаємодії регулюються процесами, що виходять за рамки традиційно визначених рецепторів, наприклад, перенесення РНК чи мітохондрій до інших судинних або циркулюючих клітин. Ці складні та іноді суперечливі взаємодії, здається, безпосередньо впливають на захворювання. Під час певних стадій інфекції тромбоцити ініціюють активацію як вродженого, так і адаптивного

імунітету, що є корисним для господаря. Однак неконтрольоване пошкодження ендотелію та запалення в результаті прогресування інфекцій різної етіології можуть призвести до несприятливих протромботичних реакцій і підвищення ризику серцево-судинних захворювань. Таким чином, тромбоцити, мабуть, мають широкі та багатогранні функції, що грунтуються на взаємодії їх судинних клітин. Підтримання цих складних і чітких станів активації є обов'язковим для регуляції судинного гомеостазу.

1.7. Антитромбоцитарна терапія та комплексна функція тромбоцитів

На додаток до постійного використання відомих інгібіторів тромбоцитів, був досягнутий великий прогрес у розробці антиагрегантної/антитромботичної терапії для лікування різних тромботичних патологій. Циклооксигеназа (COX) у тромбоцитах, відповідальна за генерацію TxA2 і утворення тривимірного згустку, була спрямована на регуляцію активності тромбоцитів. Тромбоцити містять переважно COX1, тоді як ендотеліальні клітини можуть містити COX1 і COX2. Аспірин є необоротним інгібітором активності COX, і оскільки тромбоцити не регенерують білок COX, цей препарат є ефективним інгібітором потенціалу агрегації тромбоцитів. Аспірин забезпечив корисну ефективну вторинну профілактику артеріальних тромбоемболічних подій. Інгібування протромботичної активності тромбоцитів аспірином також вважається корисним при таких інфекційних захворюваннях, як грип. Що стосується ролі тромбоцитів у розвитку раку, припускають, що аспірин може бути корисним для запобігання утворенню тромбоцитарних мікротромбів навколо ракових клітин у системі кровообігу, що може сприяти метастазам [38].

Цікаво, що інгібітор тромбіну, гірудин, який зв'язує та пригнічує тромбін і запобігає утворенню фібрину, не блокує ущільнення ушкодженої судини. Це спостереження свідчить про те, що ядро та оболонка згустків можуть утворюватися без фібрину, але це може вплинути на стабільність і

ретракцію. Нарешті, агоністи/антагоністи TLR можуть бути корисними для стимулювання імунної функції тромбоцитів і виживання інфекції, можливо, залежно від конкретного рецептора. Це узгоджується зі спостереженням про те, що видалення тромбоцитів перед зараженням вірусом, що активує TLR7, EMCV, призводить до зниження виживаності мишей. У міру прогресу терапії, спрямованої на тромбоцити, необхідно враховувати тип травми, механізм/тип інфекції та час інфікування [39].

1.8. D-димер та його біологічна роль

D-димер є непрямим маркером фібринолізу та обміну фібрину; ця молекула демонструє унікальні властивості як біологічний маркер порушень гемостазу, а також індикатор внутрішньосудинного тромбозу.

Молекули D-димеру утворюються шляхом розпаду зшитого фібрину під час фібринолізу. Утворення D-димеру вимагає активності трьох ферментів: тромбіну, активованого фактора XIII (фактор XIIIa) і плазміну. Процес починається, коли тромбін, що утворюється коагуляційною системою, перетворює розчинний фібриноген на мономери фібрину. Потім ці мономери утворюють полімери фібрину через нековалентні взаємодії на основі алостеричних змін у білку в результаті відщеплення тромбіном фібринопептидів від N-кінцевого домену (рис. 1.8.1). Фібрин зміцнюється завдяки взаємодії з фактором XIII, який після активації тромбіном перехресно зв’язує домени D сусідніх мономерів фібрину. Розщеплення фібринового згустку плазміном призводить до утворення молекули D-димеру [40].

Наявність молекул D-димеру свідчить про внутрішньосудинну коагуляцію, оскільки вона може утворюватися лише після утворення тромбіну та подальшого розпаду зшитого фібрину. Через це вимірювання D-димеру служать глобальним маркером активації коагуляційної та фібринолітичної систем і функціонують як непрямий маркер тромботичної та наступної тромболітичної активності.

Присутність або відсутність молекул D-димеру в різних патологічних станах можна використовувати по-різному. Аналіз D-димеру має вирішальне значення для лабораторної діагностики тромбозу глибоких вен, тромбоемболії легеневої артерії та дисемінованої внутрішньосудинної коагуляції [41].

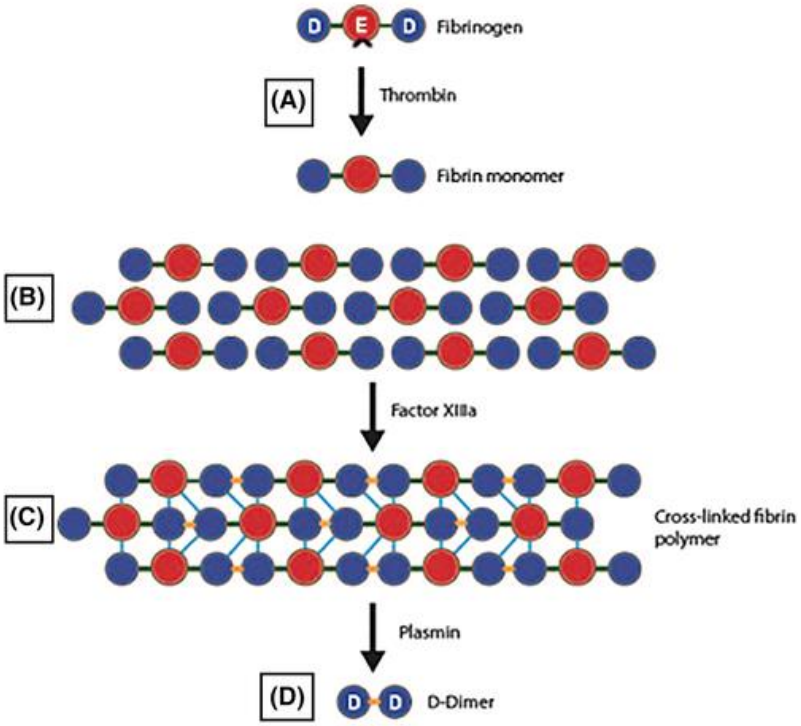

Рис. 1.8.1. Утворення D-димеру після утворення тромбіну та фібринолізу [42]

A) тромбін відщеплює фібринопептиди від Е-домену фібриногену, утворюючи мономери фібрину;

B) мономери фібрину агрегують;

C) мономери фібрину зшиваються під дією фактора XIIIa з утворенням фібринового згустку;

D) деградація зшитих полімерів плазміном призводить до вивільнення продуктів деградації фібрину, включаючи D-димер.

D-димер виявляють і кількісно визначають у цільній крові, плазмі або сироватці за допомогою моноклональних антитіл, які розпізнають специфічний епітоп на перехресно зв'язаних молекулах D-димера, які інакше відсутні в D-домені фібриногену та мономерів фібрину, що не є перехресно зв'язаними. Доступно принаймні 30 комерційних аналізів D-димеру, але є три

загальні типи: імуноферментні аналізи (ELISA), імунофлуоресцентні аналізи та аналізи латексної аглютинації.

Аналіз D-димеру Vidas, широко використовуваний метод, за повідомленнями, не показує впливу гепарину, білірубіну, гемоглобіну, продуктів розпаду фібрину або помутніння плазми.

Різні лабораторні аналізатори мають чутливість у діапазоні 93-95 % і специфічність приблизно 50 % при діагностиці тромботичних захворювань.

Несправжній позитивний результат можливий у таких випадках: хвороби печінки, високий ревматоїдний фактор, запалення, онкологічне захворювання, травма, вагітність, нещодавно перенесене хірургічне втручання.

Хибнонегативний результат зустрічається у випадках, якщо аналіз узятий дуже швидко після формування тромбу, або навпаки, через кілька днів. Крім того, присутність антикоагулянтів може призводити до негативного результату, оскільки вони перешкоджають зростанню тромбу.

Хибні показання можуть спостерігатися у випадках, якщо обсяг зразка для аналізу менший або більший за необхідний. Це спостерігається внаслідок дилюційного ефекту антикоагулянтів (зразок крові необхідно розбавляти антикоагулянтом у співвідношенні 9:1)

Ставлення правдоподібності визначається чутливістю та специфічністю, співвіднесеними з попередньою ймовірністю.

При інтерпретації тесту на D-димери для пацієнтів віком понад 50 років величина, що дорівнює віку ×10, є патологічною [43].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об’єкти та матеріали досліджень

Об’єктами лабораторних досліджень слугували білі безпородні щури. Для формування вибірки відбирали тварин віком 2,5–3 місяці та масою 160-180 г. Виконання експериментальних досліджень в розрізі кваліфікаційної роботи проводили, дотримуючись ключових положень «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях», задокументованих у м. Страсбург (1986). Згідно рекомендацій Шостого національного конгресу України з біоетики, який відбувався в м. Києві (2006), дотримувалися усіх етичних норм поводження із лабораторними тваринами.

Усіх дослідних щурів на початку експерименту розміщували у пластмасові клітки із попередньо простерилізованою в сухожаровій шафі піщаною підстилкою (білий пісок), надавши їм вільний доступ до води. Протягом всього експерименту щури споживали напівсинтетичну дієту, затверджену Американським інститутом харчування [44].

Щоб змоделювати стан аліментарної нестаці протеїну група щурів щоденно отримувала напівсинтетичний низькопротеїновий раціон впродовж 28 днів. Такий раціон містив 1/3 харчового протеїну (у вигляді казеїну) у перерахунку на 1 кілограм дієти (140/3 = 46,6 г) [45].

Ацетамінофен-індуковане ураження організму моделювали шляхом перорального введення парацетамолу (ацетамінофену) дослідним щурам, використовуючи дозу 1250 мг/кг маси тварини. Розчин парацетамолу готували у вигляді 2 % крохмальної суспензії [45].

Контрольним і дослідним групам тварин впродовж всього експерименту давали однакову кількість їжі (35 г раціону), дотримуючись принципу парного харчування, що ґрунтується на зрівнюванні маси тіла дослідних та контрольних щурів, щоб уникнути розвитку стрес-специфічних реакцій.

У ході експериментальних досліджень дослідні щури були поділені на групи:

1 – тварини, які впродовж 28 днів отримували напівсинтетичну дієту, що містила всі макро- та мікронутрієнти –контрольна група (К);

2 – тварини, які 4 тижні перебували на напівсинтетичній низькопротеїновій дієті (1/3 нормованої кількості добової потреби білка) (НПР);

3 – тварини, яким моделювали ацетамінофен-індуковане ураження організму (ТУ);

4 – тварини, яким після перебування на низькопротеїновій дієті вводили токсичні дози ацетамінофену (НПР/ТУ).

На дієті дослідні щури перебували впродовж 28 днів. Умертвіння дослідних щурів проводили методом цервікальної дислокації, використовуючи легкий ефірний наркоз на 29 та 31 доби експерименту.

2.2. Спосіб приготування, фіксації та фарбування мазків крові

Необхідною умовою для правильної характеристики морфологічних особливостей формених елементів є правильно зроблений та добре забарвлений мазок крові.

Техніка приготування мазків. Мазок крові готується шліфованим склом з ідеально рівним краєм, ширина якого повинна бути приблизно на 2-3 мм предметного скла. Після проколу пальця до краплі крові торкаються предметним склом на відстані 1,5-2 см від його краю, не торкаючись шкіри в місці уколу. Крапля крові на предметному склі повинна мати діаметр 2-3 мм.

Шліфоване скло ставлять на предметне під кутом 45° на 1-2 мм перед краплею, потім зрушують так, щоб воно торкнулося крові і крапля розтіклася по краю шліфованого скла. Потім швидким легким рухом справа наліво робиться мазок. Вся крапля на предметному склі повинна бути вичерпана. За цієї умови мазок закінчується нерівно – «щіткою».

Правильно підготовлений мазок повинен займати приблизно 3/4 предметного скла, мати початок, чітко окреслені краї, бути тонким і однорідним. Тонкий мазок жовтуватого кольору, напівпрозорий, формені елементи в ньому розташовуються в один шар. Товстий мазок не придатний

для дослідження, тому що клітини в ньому розташовуються в декілька шарів і деформуються. Висохлий на повітрі мазок підписують простим (не хімічним) олівцем або кутом предметного скла ближче до початку мазка. Для аналізу роблять щонайменше два мазки.

Фіксація мазків захищає формені елементи крові від впливу води, що міститься в фарбах, під впливом якої в нефіксованих препаратах відбувається гемоліз еритроцитів і змінюється морфологія лейкоцитів. Фіксатор також викликає коагуляцію білків та закріплює мазок на склі. Найкращими фіксаторами є метиловий спирт (час фіксації 3-5 хвилин) або розчин еозину метиленового синього за Меєм-Грюнвальдом. За відсутності зазначених фіксаторів використовують етиловий спирт 96° (час фіксації 30 хв), денатурований спирт (30 хв), хлороформ (кілька секунд), формалін (1 хв), ацетон (5 хв), суміш Нікіфорова (20 хв).

Сухі мазки опускають у широкогорлу банку з фіксатором на необхідний час фіксації. Потім витягують пінцетом та висушують на повітрі. При цьому необхідно стежити, щоб поверхні скла з мазками не торкалися один одного. Фіксацію мазків можна проводити і в спеціальних контейнерах, опускаючи в кювету з фіксатором.

Фарбування зразків. До складу фарби входять: азур II (суміш рівних кількостей азура I та метиленового синього) та еозин. Фарбу випускають готову у флаконах із темного скла із зазначенням на етикетці дати випуску та серії, а також у порошку. Для приготування основного розчину навішування сухої фарби 3,8 г розчиняють у 250 мл метилового (краще) або етилового спирту 96°. Розчин залишають на 3-5 діб, часто збовтуючи для кращого розчинення фарби. Потім доливають 250 мл хімічно чистого гліцерину і знову залишають на 3-5 днів, часто помішуючи. Приготований таким чином основний розчин фарби добре зберігається тривалий час у темних суліях у шафі, де немає ні кислот, ні лугів. Основний розчин фарби Романовського-Гімзи концентрований, потребує розведення перед використанням. Перед вживанням готовий чи приготований основний

розчин барвника перевіряють на активність. У трьох циліндрах готують різні розведення фарби з розрахунку 1 крапля концентрованого барвника на 1 мл нейтральної дистильованої води, 2 краплі на 1 мл, 3 краплі на 1 мл. Кожним з розчинів фарбують 5-6 зафіксованих мазків крові протягом різного часу: 20, 25, 30, 35 та 40 хв. На кожному мазку відзначають час, протягом якого він буде забарвлений. Потім фарбу з мазків змивають дистильованою водою. Мазки висушують, мікроскопують і визначають розведення фарби та час, при яких отримано найкраще забарвлення. Розведення приймається за титр серії фарби, а час забарвлення – за постійну експозицію. Ці дані вказують на етикетці пляшки. Наприклад, 3 краплі барвника на 1 мл дистильованої води, експозиція – 25 хв. Для фарбування мазків крові завжди використовують свіжоприготовлений робочий розчин фарби. Для розведення фарби краще користуватися фосфатним буфером.

Фіксовані сухі мазки поміщають у контейнер, який опускають у кювету з робочим розчином барвника і витримують у ньому певний час, підібраний кожної партії фарби, – від 20 до 40 хв. Потім контейнер переносять у кювету з водопровідною водою, після чого мазки ставлять вертикально у штатив для сушіння. За відсутності штатива-контейнера висушені мазки фарбують на «рейках», заливаючи мазок робочим розчином барвника можливо вищим шаром (3-4 мл на мазок).

«Рейки» (або «місток») монтують із двох однакового діаметра та довжини скляних трубок або піпеток, які з'єднують між собою гумовою трубкою. Відстань між паралельно розташованими трубками має бути 5-6 см. Рейки укладають на емальований лоток або іншу ємність. Фарбу зі скла змивають водопровідною водою, не знімаючи шибки з «рейок» і висушують на повітрі у вертикальному положенні [47].

2.3. Дослідження кількісного вмісту тромбоцитів

Тромбоцити – це круглі утворення діаметром 2-3 мкм рожево-фіолетового відтінку. Підраховують тромбоцити у мазках крові за допомогою

світлового мікроскопа, використовуючи об’єктив ×100 та імерсійну олію, що пропускає мінімальну кількість світла.

Кількість тромбоцитів підраховували у 10 полях об’єктиву, після чого розраховували їх середню кількість у зазначеній ділянці. Щоб обчислити абсолютний показник вмісту тромбоцитів потрібно значення їх середнього вмісту на полі зору помножити на 20000 [48].

2.4. Оцінка середнього об’єму, ширини розподілу тромбоцитів та тромбокриту

Оцінку показників середнього об’єму тромбоцитів, ширини розподілу тромбоцитів та тррмбокриту проводили, використовуючи автоматичний гематологічний аналізатор КТ-40 (Genrui, КНР) на базі КПН «Чернівецька міська поліклініка № 2).

2.5. Визначення рівня D-димеру

Одним із варіантів латексного методу визначення D-димеру є метод мікролатексної аглютинації з фотометричною реєстрацією реакції (імунотурбідиметрія). Суть методу полягає в тому, що при додаванні плазми, яка містить D-димер, до реагенту відбувається збільшення оптичної оптичної густини розчину реагенту, що є суспензією мікролатексних частинок, покритих антитілами проти D-димеру. При цьому вимірюване збільшення оптичної щільності пропорційно концентрації D-димеру в досліджуваному зразку.

Комерційні набори для визначення D-димера розроблені для автоматичних аналізаторів (біохімічних та коагулометрів), що дозволяє виконувати дослідження цього аналізу в рутинному режимі.

При виборі реагентів для визначення концентрації Д-димеру необхідно враховувати стабільність латекс-реагенту після розкриття, наявність калібрувального та контрольного матеріалів, зручність у використанні,

специфічність та чутливість тесту, межі лінійності вимірювань. Недоліком методу є його низька чутливість [49].

2.6. Статистична обробка експериментальних даних

Статистичні дані опрацьовували, використовуючи програму *Microsoft* Excel 2016 на персональному комп'ютері. Основні статистичні показники представляли за їх кількісними параметрами (середнє арифметичне значення – M; стандартна похибка – m). Під час визначення статистично вірогідних відмінностей між середніми показниками використовували критерій Стьюдента (t). Різниці вважали достовірними при $P \leq 0{,}05$.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Тромбоцити відіграють ключову роль у первинному гемостазі та мають негемостатичні властивості, залучені до ангіогенезу, відновлення тканин, запалення та метастазування. Крім того, тромбоцити зберігають цілісність судин у запалених судинах. Інші фактори можуть впливати на властивості тромбоцитів і, таким чином, на ризик кровотечі, наприклад, ліки, низький гематокрит, порушення системи зсідання крові або переливання дисфункційних донорських тромбоцитів. Наприклад, у пацієнтів з лейкемією та імунною тромбоцитопенією знижена активація тромбоцитів, агрегація тромбоцитів або тромбопоез, що відображається у зниженій присутності сітчастих тромбоцитів, асоціюється з фенотипом кровотечі. Однак механізми розуміння причини зниження функції тромбоцитів при різних тромбоцитопенічних станах є незначними, за винятком деяких спадкових захворювань тромбоцитів [50].

Результати досліджень показали, що в усіх дослідних групах щурів спостерігається зниження кількості тромбоцитів порівняно з контрольними величинами (рис. 3.1). У тварин, які споживали низькопротеїновий раціон (група НПР), кількісні значення тромбоцитів виявлялися в 1,7 рази нижчими порівняно з показниками у щурів, які протягом експериментального періоду отримували напівсинтетичний повноцінний раціон (контрольна група).

Водночас надходження в організм токсичних доз медикаментозного ксенобіотика – ацетамінофену незалежно від кількості отримання харчового протеїну в складі дієти (дослідні групи тварин ТУ та НПР/ТУ) призводить до максимального зниження (у 5 разів порівняно з контрольними значення) кількості тромбоцитів у крові дослідних щурів (рис. 3.1).

Отримані нами результати досліджень засвідчують розвиток тромбоцитопенії в дослідних групах щурів. Кількість тромбоцитів використовується для моніторингу тромбопоезу. У клініці тромбоцитопенія неоднозначно визначається тоді, коли кількість тромбоцитів $<150\times10^9$/л.

Основними причинами тромбоцитопенії можуть бути порушення продукції тромбоцитів та/або підвищене руйнування тромбоцитів. Найчастіше зустрічається аутоімунна тромбоцитопенія.

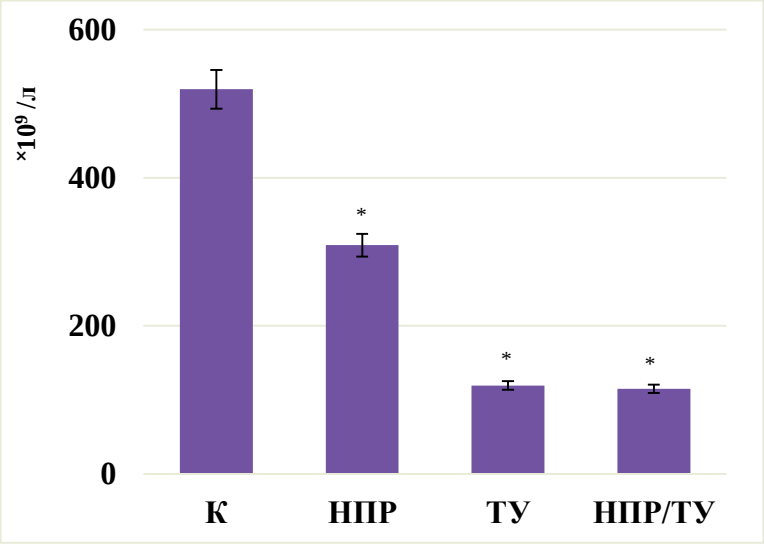

Рис. 3.1. Рівень тромбоцитів у крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження

Примітка (тут і надалі):

К – щури, які отримували 28 днів повноцінний напівсинтетичний раціон – контрольна група;

НПР – тварини, які протягом 4 тижнів експерименту перебували на раціоні, дефіцитному за кількістю харчового протеїну;

ТУ – щури, яким моделювали гостре ацетамінофен-індуковане токсичне ураження;

НПР/ТУ – тварини, яким після 4 тижнів обмеження споживання харчового протеїну моделювали токсичне ураження;

***** – вірогідна відмінна різниця числових значень порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.

Швидкий розвиток тромбоцитопенії може опосередковуватися через посилений кліренс/руйнування тромбоцитів. Тромбоцити можуть бути активовані імунними комплексами антиген-антитіло або запальними реакціями господаря; активовані тромбоцити легше виводяться з кровообігу ретикулоендотеліальною системою [51].

Тромбоцити відіграють важливу роль у передачі сигналів запалення, а також у відповіді на інфекцію. Поєднуючи тромботичну та імунну функції, тромбоцити можуть допомогти зосередити гемостаз та імунну відповідь проти потенційних інфекційних агентів, щоб запобігти мікробній інвазії.

Тромбоцити взаємодіють через різноманітні рецептори, включаючи Toll-подібні рецептори [52].

Тромбоцити також відіграють певну роль у залученні та активації циркулюючих лейкоцитів на поверхні ендотелію, що призводить до діапедезу лейкоцитів. Взаємодія між ендотеліальними клітинами, тромбоцитами та лейкоцитами відіграє вирішальну роль у прокоагулянтному ефекті розвитку патологічних станів. Тромбоцитопенія, секреція тромбоцитів і взаємодія з лейкоцитами можуть мати шкідливі або захисні імунні наслідки за даних експериментальних умов.

Тромбоцити важливі для первинного гемостазу, оскільки вони прилипають, поширюються та агрегують у місці пошкодження судини, що в у кращому випадку зупиняє кровотечу. У пошкодженій судині тромбоцити прилипають до іммобілізованого фактора фон Віллебранда через тромбоцитарний глікопротеїн (GP)Iba та через зв'язування колагену з α2β1 і GPVI. Під час цього процесу тромбоцити активуються та вивільняють тромбоцитарні гранули, змінюють форму та активують рецептор фібриногену GPIIb/IIIa. Вміст гранул, зокрема АДФ, швидко активує велику кількість тромбоцитів. Зміна форми призводить до поширення тромбоцитів, що обмежує кровотечу та забезпечує поверхню для агрегації тромбоцитів [29].

Раніше вважалося, що основним механізмом появи тромбоцитопенії при є активне руйнування цих клітин під впливом аутоантитіл. Проте, в даний час, крім традиційної патогенетичної теорії розвитку тромбоцитопенії, велике значення приділяється порушенню продукції тромбоцитів у кістковому мозку, а також Т-клітинним механізмам їх руйнування. Сучасна концепція етіопатогенезу передбачає одночасну наявність кількох складних механізмів, що провокують виникнення захворювання:

- ✓ продукцію аутоантитіл до рецепторів мембрани тромбоцитів;
- ✓ підвищену деструкцію комплексу антиген/антитіло у селезінці;
- ✓ комплементопосередкований лізис тромбоцитів;
- ✓ лізис тромбоцитів Т-лімфоцитами;

- ✓ неадекватну продукцію тромбоцитів [53].

Основним цитокіном, що стимулює утворення тромбоцитів, є тромбопоетин. Відсутність компенсаторного збільшення рівня тромбопоетину у відповідь на виражену імуноопосередковану тромбоцитопенію є важливим патофізіологічним механізмом розвитку тромбоцитопенії.

Відомо, що токсичність ацетамінофену напряму та/або опосередковано викликає розвиток запальних реакцій в організмі, що сприяє прогресуванню медикаментозного ураження печінки, внаслідок чого запуск коагуляційного каскаду може порушуватися.

Окрім того, при передозуванні зазначеним ксенобіотиком в сироватці крові спостерігається зниження концентрації фібриногену, а також деяких факторів системи зсідання крові, що відображає зміни як первинного, так і вторинного гемостазу.

Незрілі тромбоцити можуть бути більш гемостатично активними, ніж старі тромбоцити. Оскільки незрілі, щойно вивільнені тромбоцити багаті мРНК, їх можна ідентифікувати за допомогою флуоресцентного мічення. Фракція незрілих тромбоцитів залежить від причини тромбоцитопенії [12].

Водночас зниження кількості тромбоцитів у крові всіх дослідних груп характеризується одночасним зростання середнього об’єму тромбоцитів (рис. 3.2). Слід відмітити, що в групах щурів із токсичним ураженням ТУ та НПР/ТУ досліджуваний показник досягає максимальних значень. Цей показник у клініці відображає розміри циркулюючих в крові тромбоцитів на момент часу взяття крові. Ймовірно, отримані нами результати, можуть бути пов’язані з посиленням агрегації тромбоцитів, внаслідок чого їх загальна кількість зменшується за рахунок збільшення середнього об’єму.

Наприклад, в літературі [54] зазначається, що в пацієнтів із синдромом Бернара-Сульє спостерігається тромбоцитопенія з гігантськими тромбоцитами на додаток до функціональних дефектів, таких як порушення адгезії тромбоцитів до субендотелію та зниження агрегації тромбоцитів. Це пов’язано з ураженнями глікопротеїнового комплексу тромбоцитарної

мембрани GPIb–IX–V, який містить сайт зв'язування фактора фон Віллебранда, глікопротеїну плазми, важливого для адгезії тромбоцитів до ендотелію. Таким чином, здається, що GPIb–IX–V може бути необхідним для ефективного утворення тромбоцитів. Насправді дослідження *in vitro* показали, що антитіла проти GPIb–IX–V сильно пригнічують утворення протромбоцитів і що МК, не розширюють протромбоцити *in vitro*. Ці дослідження показують, що одним із механізмів, за допомогою якого може виникати макротромбоцитопенія є дефектне утворення протромбоцитів.

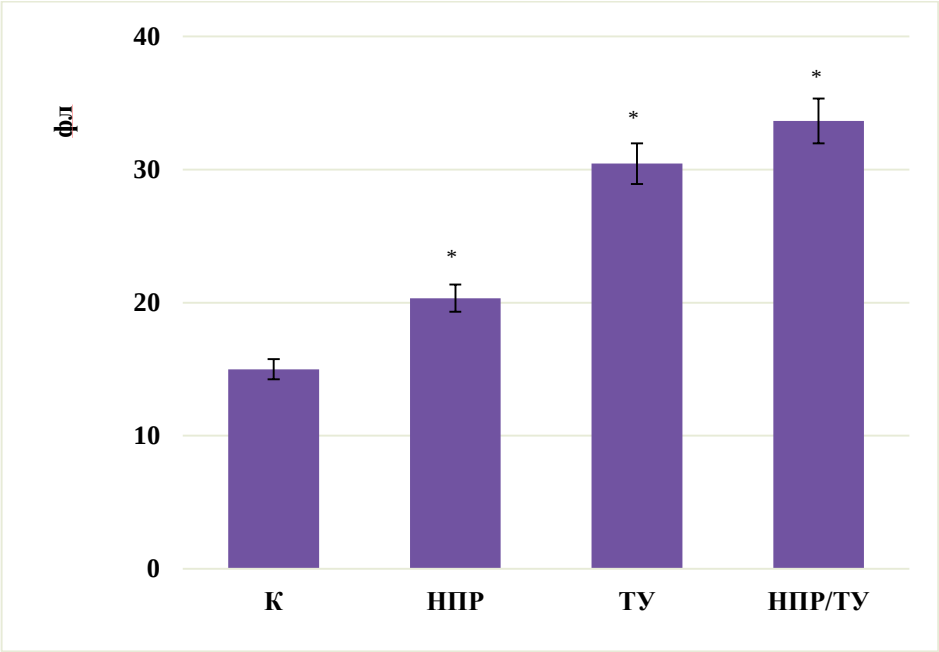

Рис. 3.2. Середній об'єм тромбоцитів у крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження

Початкова адгезія та активація тромбоцитів супроводжуються залученням додаткових тромбоцитів із кровообігу та утворенням тривимірних агрегатів через низку молекулярних взаємодій. Залучення інших тромбоцитів, їх активація та агрегація тромбоцитів опосередковані тромбоцитарним утворенням тромбоксану А2 (ТхА2) і вивільненням АДФ з їхніх δ-гранул. Взаємодія тромбоцитів під час утворення тромбів додатково опосередковується та стабілізується рецептором фібриногену тромбоцитів GP2b/3a2 [14].

Під час підрахунку кількості тромбоцитів у полі зору світлового мікроскопа нами зареєстровано певні морфологічні зміни тромбоцитів у різних дослідних групах щурів, підтвердженням чого слугують фотографії мікропрепаратів мазків крові (рис. 3.3).

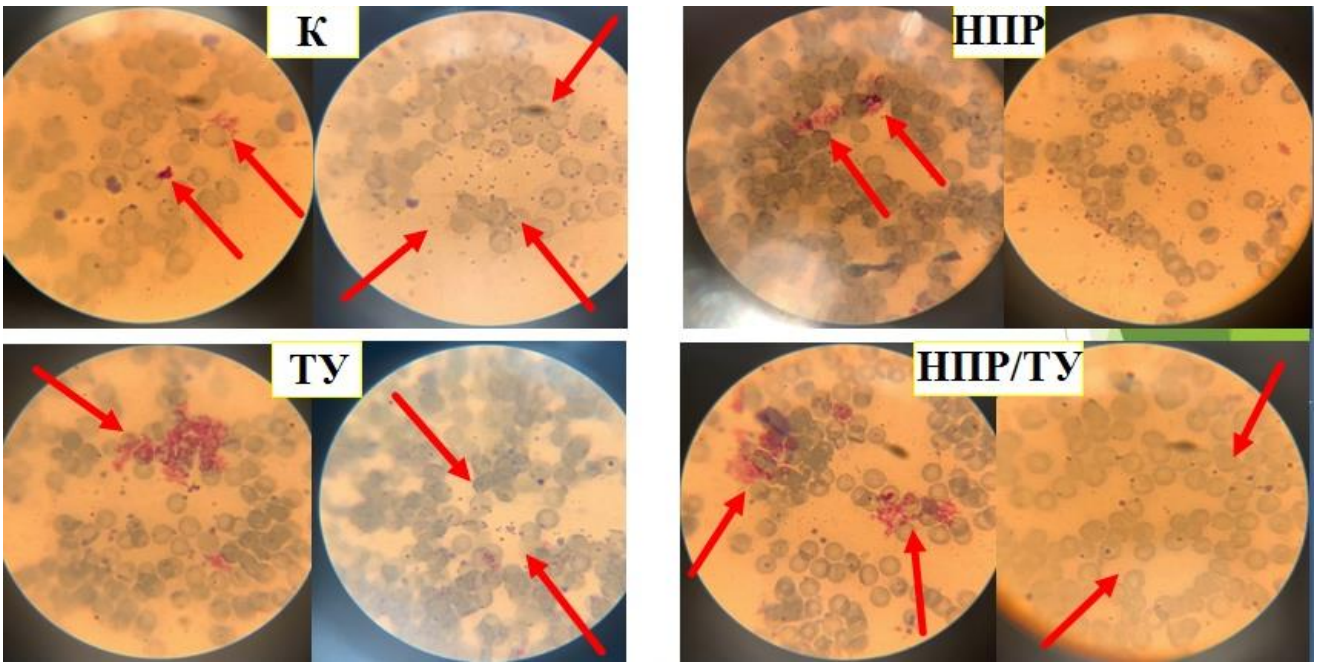

Рис. 3.3. Фотографії мікропрепаратів мазків крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження

Як видно з рис. 3.3, у зразку контрольної крупи щурів (група К) переважно зустрічаються поодинокі тромбоцити і лише зрідка можна зафіксувати незначну кількість скупчень, які, як ми припускаємо, забезпечують адгезивно функції тромбоцитів за фізіологічних умов.

Водночас у групі щурів, які споживали низькопротеїновий раціон (група НПР) відмічається набагато більше таких скупчень, що узгоджується зі збільшенням за даних експериментальних умов показника середнього об’єму тромбоцитів.

Введення токсичних доз медикаментозного ксенобіотика – ацетамінофену (групи ТУ та НПР/ТУ) призводить до абсолютно негативних змін: поодинокі тромбоцити в мінімальній кількості на противагу значній частці тромбоцитарних скупчень. Слід наголосити, що навіть при заборі крові у

дослідних тварин груп ТУ та НПР/ТУ відбувається практично майже її миттєве зсідання.

При дослідженні тромбоцитарних індексів нами встановлено зростання індексу ширини розподілу тромбоцитів у всіх дослідних групах щурів, причому максимальні значення зареєстровані за умов введення токсичних доз ацетамінофену (рис. 3.4).

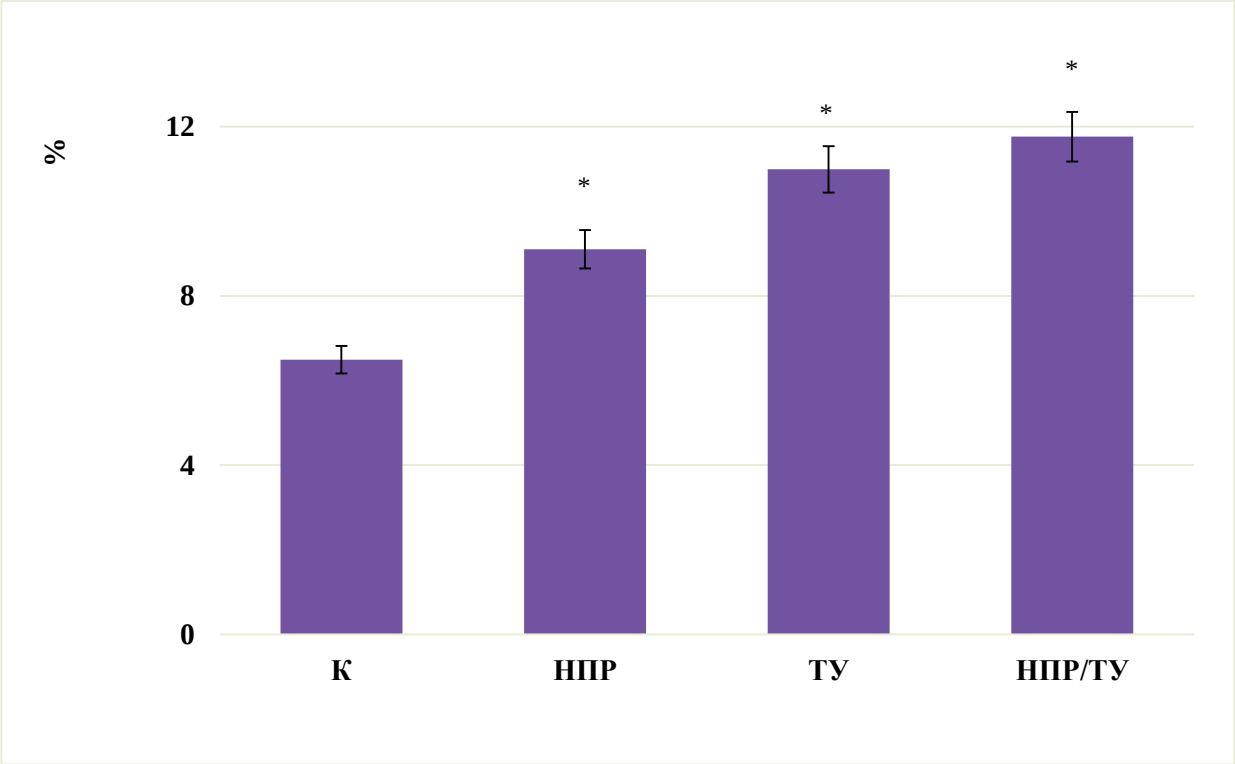

Рис. 3.4. Ширина розподілу тромбоцитів (PDW) у щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження

Ширина розподілу тромбоцитів (PDW) – це показник гетерогенності, тобто неоднорідності клітин одного типу. Він показує, які форми тромбоцитів переважають у загальній масі. Зростання вказаного параметру може спостерігатись за умов підвищення ступеня агрегації тромбоцитів та наявності мікрозгустків, що підтверджується фотографіями мікропрепаратів мазків крові (рис. 3.3).

Перетворення пре-тромбоцитів у протромбоцити здійснюється силами мікротрубочок, які визначаються двома основними біофізичними

властивостями: діаметром клубка мікротрубочок і товщиною клубка мікротрубочок. Цікаво, що ці сили регулюють і прогнозують розмір циркулюючих тромбоцитів, утворених протромбоцитами, пояснюючи діаметр тромбоцитів ~2 мкм. Це підтверджує модель, у якій кільцеві претромбоцити вивільняються в кров, швидко й спонтанно перетворюються на протромбоцити, що призводить до утворення зрілих тромбоцитів. Крім того, претромбоцити можуть потрапити в мікрокапіляри кісткового мозку, легенів або селезінки, де внутрішньосудинні сили зсуву спонукають протромбоцити до виробництва тромбоцитів [18].

Тому розмір тромбоцитів (рис. 3.2) корелює з реактивністю тромбоцитів; більші тромбоцити мають більший протромботичний потенціал. Підвищений розмір тромбоцитів (середній об'єм тромбоцитів) пов'язаний зі збільшенням агрегації тромбоцитів, підвищеною експресією молекул адгезії та підвищеним ризиком ураження периферичних артерій, що можна припустити за умов надходження токсичних доз ацетамінофену.

Цікаво, що дослідження пацієнтів із гострою коронарною хворобою виявило прямий зв'язок між експресією ланцюга α2-інтегрину та середнім об'ємом тромбоцитів, що свідчить про те, що рівні експресії інтегрину α2β1 може брати участь у регуляції розміру тромбоцитів. Нещодавно це було підтверджено створенням умовного МК-специфічного α2-інтегринового ланцюга – миші з дефіцитом, у яких отримані тромбоцити мають значно зменшений середній об'єм тромбоцитів [55].

Натомість зниження тромбокриту (рис. 3.5), тобто співвідношення об'єму тромбоцитів до об'єму рідинної частки крові за умов даних експериментальних умов однозначно є наслідком тромбоцитопенії (рис. 3.1).

Це може статися з трьох причин. По-перше, організм затримує тромбоцити у селезінці. У нормі селезінка відфільтровує з крові небажані речовини та старі зруйновані клітини, у тому числі тромбоцити. Але при деяких захворюваннях селезінка збільшується в розмірах і починає затримувати та дуже активно утилізувати тромбоцити. А тому їхня кількість у

крові знижується. По-друге, організм виробляє менше тромбоцитів, ніж потрібно. По-третє, організм використовує або руйнує тромбоцити швидше, ніж зазвичай. Це трапляється при тяжких бактеріальних інфекціях, аутоімунних захворюваннях, гемолітико-уремічному синдромі, через прийом деяких ліків, у тому числі сульфовмісних антибіотиків, протисудомних засобів і препаратів, що розріджують кров (антикоагулянтів).

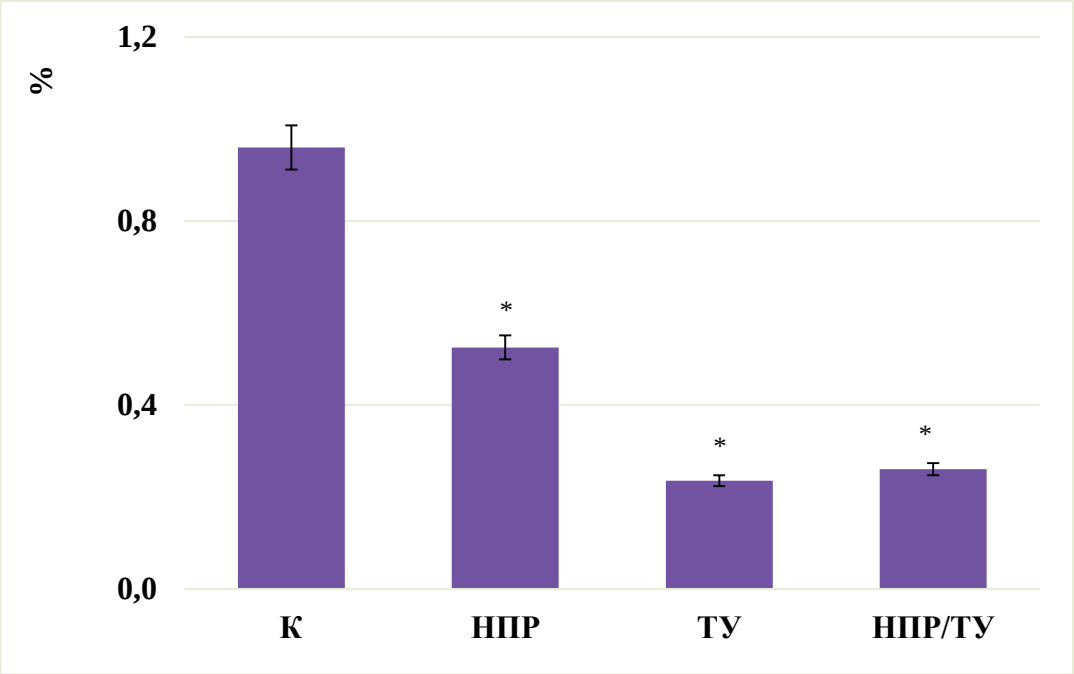

Рис. 3.5. Показник тромбокриту у щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження

Отже, токсичне ураження виступає ключовим фактором зниження кількості тромбоцитів у крові та тромбокриту, підвищення їх середнього об’єму з одночасним збільшенням ширини розподілу за наявності гігантських тромбоцитарних скупчень, що можна розглядати як передумову порушення первинної тромбоцитарної ланки гемостазу.

Водночас нами встановлено, що в усіх дослідних групах щурів спостерігається підвищення рівня D-димеру з максимальними значеннями за умов введення токсичних доз ацетамінофену на тлі білкової недостатності (рис. 3.6).

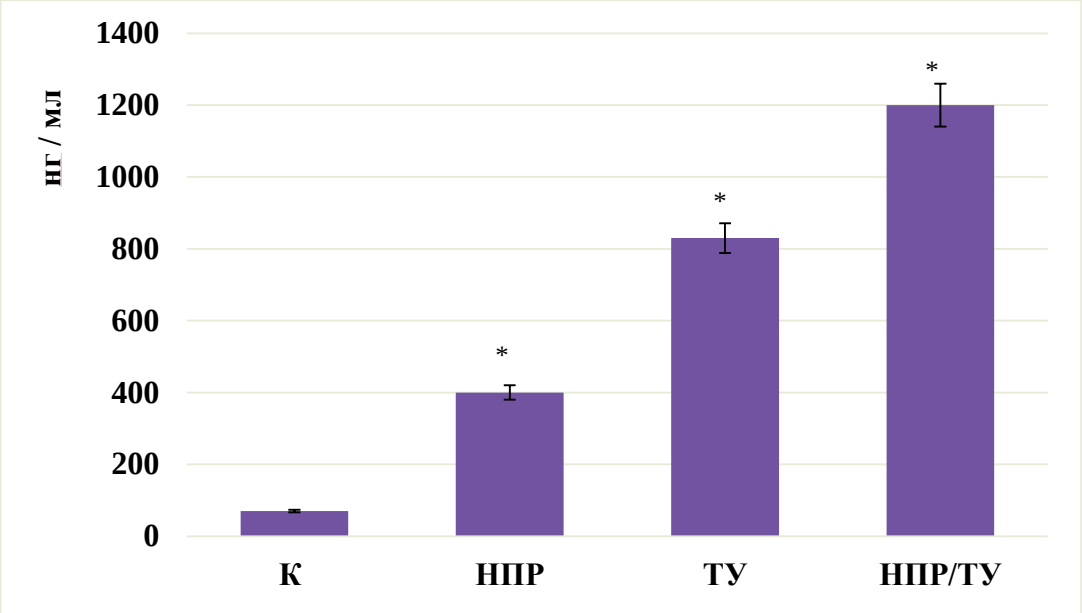

Рис. 3.6. Вміст D-димеру крові щурів за умов аліментарної нестачі протеїну та ацетамінофен-індукованого ураження

D-димер – це фрагмент фібрину, що містить один перехресний зв'язок між ланцюгами мономерів. Він утворюється як специфічний продукт розпаду зшитого фібрину під впливом плазміну.

Організм при тромбозі запускає механізми, що сприяють руйнуванню тромбів, в ході їх роботи фібрин починає руйнуватися та утворюються D-димери. Таким чином, кількість D-димерів у крові вказує на активність процесів руйнування тромбів та опосередковано дозволяє оцінити активність тромбоутворення.

Коагуляція – утворення згустка крові або тромбу – починається при активації білків згортання: або при контакті з пошкодженою стінкою кровоносної судини («зовнішній шлях» згортання), або під впливом факторів згортання, що містяться в плазмі («внутрішній шлях» згортання). Обидва шляхи активації призводять до генерації тромбіну – ферменту, який перетворює розчинний білок крові фібриноген на фібрин, своєю чергою фібрин утворює фібринове волокно. Інший фермент, що генерується тромбіном, фактор XIII, потім зшиває фібринове волокно поперечними

сполуками, що призводить до утворення нерозчинного гелю, що є каркасом для утворення згустку крові.

Циркулюючий у крові ензим плазмін – основний фермент фібринолізу – розщеплює фібриновий гель у кількох місцях. Отримані фрагменти високомолекулярних полімерів розщеплюються плазміном ще кілька разів і залишають після себе проміжні, а потім малі полімери (продукти розпаду фібрину). Однак, поперечні зв'язки між двома фрагментами D залишаються незмінними. Типовий фрагмент, що містить D-димер, складається з двох доменів D та одного домену E від оригінальної молекули фібриногену [56].

D-димери зазвичай не присутні в плазмі крові, крім випадків, коли система зсідання крові була активована, наприклад у випадку тромбозу.

Тому якщо показники D-димеру підвищені, це може означати, що за даних експериментальних умов, в даному випадку ключовим чинником виступає токсичне ураження, організм вимушений руйнувати значні згустки крові, тобто, є ризик надмірного тромбоутворення.

Отже, аліментарна депривація протеїну посилює процес надмірного тромбоутворення за умов токсичного ураження ацетамінофеном, що характеризується максимальним підвищенням рівня D-димеру за даних експериментальних умов.

ВИСНОВКИ

1. Ацетамінофен-індуковане ураження виступає ключовим чинником зниження кількості тромбоцитів у крові та тромбокриту, зростанням їх середнього об’єму з одночасним збільшенням ширини розподілу за наявності гігантських тромбоцитарних скупчень.

2. Аліментарна депривація протеїну посилює процес надмірного тромбоутворення за умов токсичного ураження ацетамінофеном, що характеризується максимальним підвищенням рівня D-димеру за даних експериментальних умов.