

О. Л. Холодкова, М. М. Перепелюк

## КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ ТРОМБОЦИТОПАТІЇ ПРИ ЦИРОЗІ ПЕЧІНКИ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.36-004-06:616.155.2

Е. Л. Холодкова, Н. Н. Перепелюк

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРОМБОЦИТОПАТИИ ПРИ ЦИРРОЗЕ ПЕЧЕНИ

*Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина*

Цирроз печени сопровождается как печеночными, так и гематологическими осложнениями, например тромбоцитопатией. Возможности терапевтического влияния на цирроз печени ограничены, прогноз можно улучшить на начальных стадиях заболевания за счет влияния на этиологический фактор. Ранее нами было продемонстрировано позитивное влияние внутривенного применения обогащенной тромбоцитами плазмы. С учетом потенциального лимитирующего влияния тромбоцитопатии на эффективность указанной методики нами проведено электронно-микроскопическое изучение морфологии тромбоцитов у крыс с токсически-индуцированным циррозом печени. Выявлено увеличение количества активированных тромбоцитов с выраженной дегрануляцией за счет уменьшения плотности альфа- и дельта-гранул.

**Ключевые слова:** цирроз печени, обогащенная тромбоцитами плазма, тромбоцитопатия.

UDC 616.36-004-06:616.155.2

O. L. Kholodkova, M. M. Perepeliuk

### CLINICAL SIGNIFICANCE OF THROMBOCYTOPATHY IN LIVER CIRRHOSIS

*The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine*

Liver cirrhosis is accompanied by hepatic and hematologic complications, for example, thrombocytopenia. The possibilities of therapeutic influence on liver cirrhosis are limited, the prognosis can be improved at the initial stages of the disease due to the influence on the etiologic factor. Previously, we demonstrated a positive effect of intrahepatic injection of platelet-rich plasma. Taking into account the potential limiting effect of thrombocytopenia on the efficacy of this technique, we conducted an electron microscopic study of the platelets morphology in rats with toxic-induced liver cirrhosis. Increase in the number of activated platelets with marked degranulation due to decreasing the density of alpha- and delta-granules has been revealed.

**Key words:** liver cirrhosis, platelet-rich plasma, thrombocytopenia.

Цирроз печінки (ЦП), незалежно від причин, які його викликали, є тяжким захворюванням, що призводить до інвалідизації внаслідок неухильного прогресування. Крім розвитку печінково-клітинної недостатності, синдромів цитолізу гепатоцитів і внутрішньопечінкового холестазу, а також прогресування портальної гіпертензії, у цієї категорії хворих пригнічуються практично всі ростки кровотворення [1].

Серед змін кількісного і якісного складу червоної та білої крові клінічне значення має, насамперед, тромбоцитопенія та тромбоцитопатія [2], які, у поєднанні з портальною гіпертензією, є фактором ризику фатальних кровотеч з вари-

козно розширених вен стравоходу.

Можливості терапевтичного впливу на перебіг ЦП є обмеженими, кардинального впливу на прогноз вдається досягнути лише на початкових стадіях ЦП за умов ерадикації патологічного чинника, наприклад, вірусу гепатиту С, або при суттєвому ослабленні впливу невірусної антипечінкової агресії, наприклад, при токсичному або аутоімунному гепатитах з трансформацією в ЦП [3].

Раніше нами був показаний позитивний вплив локального застосування збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП). Серія досліджень, виконана нами на щурах [4; 5], продемонструвала регрес об'єму сполучної

тканини та відтворення мікроструктури печінки у тварин з експериментальним ЦП після введення ЗТП. Ефект ЗТП можна пояснити протизапальним впливом, стимуляцією мікроангіогенезу, індукцією, міграцією й адгезією прогеніторних клітин у місця введення ЗТП з подальшою диференціацією мультипотентних клітин у попередники ендотеліоцитів [6].

Утім, слід зазначити, що нами використовувалася ЗТП, отримана від здорових донорів-щурів, яку вводили піддослідним тваринам з токсично-індукованим ЦП. Коли мова йде про хворих людей з ЦП, то використання ЗТП апіорі розглядається в аутологічному варіанті. Слід ще раз зазначити, що у хворих на ЦП зменшується кількість тромбоцитів і



змінюються їхні властивості [2]. Це може бути лімітуючим чинником при досягненні «критичної» концентрації тромбоцитів зі стандартно взятого об'єму автокрові для отримання позитивного ангіогенного, трофічного, регенеруючого та інших ефектів аутологічної ЗТП. Ця проблема може бути розв'язана збільшенням об'єму автокрові для приготування ЗТП. Однак можна припустити, що не тільки кількість, а й властивості тромбоцитів змінюються при ЦП таким чином, що застосування автоЗТП не дасть очікуваного клінічного результату при місцевому введенні. Якісні зміни тромбоцитів можуть обмежувати або, навпаки, підвищувати регенераторний потенціал ЗТП при її локальному використанні.

**Метою** нашої роботи була оцінка електронно-мікроскопічних властивостей тромбоцитів у здорових щурів і тварин з  $\text{CCl}_4$ -індукованим ЦП.

### Матеріали та методи дослідження

Експеримент проводили на 20 статевозрілих щурах, поділених на групи: інтактні тварини та тварини з індукованим токсичним гепатитом. Токсичне ураження печінки моделювали шляхом перорального введення олійного розчину  $\text{CCl}_4$  концентрацією 50 % по 0,6 мл тричі на тиждень. Замість питної води тварини отримували розчин етилового спирту концентрацією 15 %. Моделювання патології тривало 70 діб.

Ультрамiкроскопічне дослідження проводили в науководослідній лабораторії кафедри гістології Дніпропетровської державної медичної академії (керівник — проф. І. В. Твердохліб). Кров збирали з хвостової вени, 3 мл крові центрифугували у гепаринізованій пробірці в режимі 900 об/хв протягом 15 хв при температурі

20–24 °С. Фракцію ЗТП переносили у префіксаційний розчин, який містив 0,1 % глютарового альдегіду ("SPI", США) у 0,1 М фосфатному буфері (рН 7,4). Через 30 хв суспензію центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв. Осад з тромбоцитами використовували для виготовлення суспензії для подальшого дослідження у відповідності зі стандартними. Зразки протягом 2 год фіксували при 2 °С у 3 % розчині глютарового альдегіду, виготовленому на 0,2 М фосфатному буфері (рН 7,4). Матеріал переносили для постфіксації в 1 % забуферений (рН 7,4) розчин тетроксиду осмію ("SPI", США) на 1 год. Зневоднювали зразки за допомогою пропіленоксиду в розчинах зростаючої концентрації.

Для виготовлення епоксидних блоків використовували композицію епон-аралдит. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікроскопі УМТП-6М ("SELM", Україна). Зрізи контрастували за Рейнольдсом при кімнатній температурі протягом 30 хв. Дослідження здійснювали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100-01 ("SELM", Україна) при напрузі прискорення 65–90 кВ і первинних збільшеннях від 2000 до 50 000.

Подальше електронно-мікроскопічне дослідження проводили за стандартною схемою [7]. Зображення електроннограм фіксували на фотоплівку Agfa з подальшим відцифруванням за допомогою сканера Canon CanoScan 9000F.

Аналіз проводили з використанням програмного пакета ImageJ 1,47v (розробка ініційована автором Wayne Rasband у Research Services Branch, National Institute of Mental Health (Меріленд, США) та поширюється без ліцензійних обмежень як суспільне надбання). Кількісну оцінку ульт-

раструктур проводили за відцифрованими електроннограмами в програмі ImageJ 1,47v відповідно до рекомендацій A. Méndez-Vilas [8].

Для кількісної оцінки ультраструктурних змін визначали відносний вміст неактивованих, агрегованих, дегранульованих і активованих тромбоцитів, а також чисельну щільність лямбда-гранул у складі грануломера тромбоцитів з урахуванням принципів роботи з цифровими зображеннями [9]. При проведенні морфометрії на ультраструктурному рівні були використані модифікації методу [10].

### Результати дослідження та їх обговорення

У щурів з  $\text{CCl}_4$ -індукованим ЦП зростає питома вага активованих тромбоцитів, причому активація відбувається за псевдоподіальним типом (рис. 1). Агрегація тромбоцитів та їхня дегрануляція в експериментальній групі суттєво перевищує показники інтактної групи. Щільність пакування альфа- і дельта-гранул тромбоцитів у щурів з ЦП значно знижена, також простежується тенденція до зменшення лямбда-гранул і кількості тромбоцитів.

### Висновки

1. Тромбоцитопатія у щурів з  $\text{CCl}_4$ -індукованим ЦП поєднується з тромбоцитопенією, яка, крім гемореологічних розладів, що обтяжують перебіг ЦП, може знижувати/змінювати загоєння післяопераційних ран, сприяти зменшенню болювого синдрому при травмах та ін.

2. Псевдоподіальний тип активації тромбоцитів у щурів експериментальної групи, разом зі зниженням вмісту альфа- і дельта-гранул, свідчить про активацію агрегації з виснаженням її потенціалу.



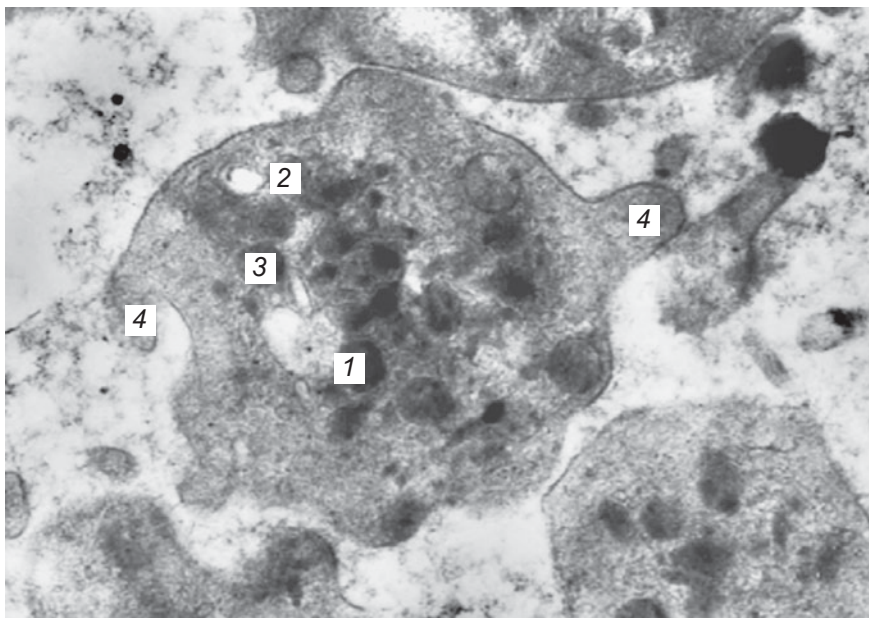


Рис. 1. Електронограма тромбоцита щура з індукованим цирозом печінки: 1 — альфа-гранула; 2 — дельта-гранула; 3 — лямбда-гранула; 4 — псевдоподія

3. Дегрануляція тромбоцитів зі значним зниженням щільності пакування альфа-гранул у щурів експериментальної групи є причиною суттєвого зниження вмісту ендотеліального фактора росту судин, факторів росту тромбоцитів і гепатоцитів тощо, які знаходяться у цих гранулах.

4. Усе вищеперелічене може знижувати/змінювати ефективність терапії з використанням ЗТП, застосованої в аутологічному варіанті, при токсичному ЦП.

5. Теоретично, можливою альтернативою аутоЗТП для використання з метою регенерації та репарації може слугувати ЗТП, виготовлена з донорської крові. Ця гіпотеза потребує як ультрамікроскопічного дослідження донорських тромбоцитів, так і перевірки в експерименті ефективності алогенної ЗТП при токсичному ЦП.

**Ключові слова:** цироз печінки, збагачена тромбоцитами плазма, тромбоцитопатія.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Губергриц Н. Б. Хронические гепатиты и циррозы печени. Современная классификация, диагностика

и лечение. Москва: Медпрактика, 2010. 328 с.

2. Колесникова Е. В. Гематологические осложнения цирроза печени. *Острые и неотложные состояния в практике врача*. 2011. № 2. С. 32–38.

3. Звягинцева Т. Д., Чернобай А. И., Харченко Н. В. Хронические заболевания печени: рук. для врачей. Изд. 3-е, переработ. и доп. Харьков: «Типография Мадрид», 2016. 260 с.

4. Gorchag D. M., Kholodkova O. L., Perepeliuk M. M. Pathogenesis of the hepatic fibrosis and possibilities of its correction. *Journal of Education, Health and Sport*. 2016. Vol. 6 (10). P. 586–600.

5. Холодкова О. Л., Горчаг Д. М. Возможности использования збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальній терапії токсичного ураження печінки. *Український морфологічний альманах*. 2013. № 11 (3). С. 63–65.

6. Lisman T., Porte R. J. The role of platelets in liver inflammation and regeneration. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010. Vol. 36 (2). P. 170–174.

7. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2007. 608 p.

8. Current microscopy contributions to advances in science and technology / A. Méndez-Vilas et al. Badajoz: Formatech, 2012. 1523 p.

9. Никоненко А. Г. Введение в количественную гистологию. Киев: Книга-плюс, 2013. 256 с.

10. Спосіб установлення координат ультраструктур при трансмісійній

електронній мікроскопії біологічних об'єктів: пат. u2013 00042 Україна № UA 83611 G01N / I. В. Твердохліб та ін.; заявл. 02.01.2013; опубл. 25.09.2013, Бюл. № 18.

#### REFERENCES

1. Gubergrits N.B. *Khronicheskie gepatity i tsirrozy pecheni. Sovremennaya klassifikatsiya, diagnostika i lechenie* [Chronic hepatitis and cirrhosis of liver. Modern classification, diagnosis and treatment]. Moscow, Medpraktika, 2010: 328.

2. Kolesnikova E.V. Hematological complication of liver cirrhosis. *Ostryie i neotlozhnyie sostoyaniya v praktike vracha* 2011; 2: 32-38.

3. Zvyagintseva T.D., Chernobay A.I., Harchenko N.V. *Khronicheskie zabolevaniya pecheni. Rukovodstvo dlya vrachey* [Chronic liver diseases. A guide for doctors]. 3rd edition, improved and added. Kharkov, "Tipografiya Madrid", 2016: 260.

4. Gorchag D.M., Kholodkova O.L., Perepeliuk M.M. Pathogenesis of the hepatic fibrosis and possibilities of its correction. *Journal of Education, Health and Sport* 2016; 6 (10): 586-600.

5. Kholodkova O.L., Gorchag D.M. A possibility of usage of plazma enriched with thrombocytes at experimental therapy of toxic injury of the liver. *Ukrayniskiy morfologichnyy almanakh* 2013; 11 (3): 63-65.

6. Lisman T., Porte R.J. The role of platelets in liver inflammation and regeneration. *Semin. Thromb. Hemost.* 2010; 36 (2): 170-174.

7. Kuo J. *Electron microscopy: methods and protocols*. Totowa, New Jersey, Humana Press Inc., 2007: 608.

8. Méndez-Vilas A., Rigoglio N.N., Mendes Silva M.V. et al. Current microscopy contributions to advances in science and technology. Badajoz: Formatech, 2012. 1523 p.

9. Nikonenko A.G. *Vvedenie v kolichestvennyu gistologiyu*. Kiev, Knigaplyus, 2013. 256 p.

10. Tverdokhlib I.V., Petruk N.S., Ivanchenko M.V. et al. Patent of Ukraine UA 83611 G01N. A method for determining the coordinates of ultrastructures in transmission electron microscopy of biological objects. 25.09.13. Bull N 18.

Надійшла до редакції 20.04.2018

Рецензент д-р мед. наук,  
проф. О. Б. Волошина,  
дата рецензії 26.04.2018

