

**ЦИТО-ГЕМАТОЛОГІЧНІ КРИТЕРІЇ ХРОНІЧНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕПАТИТУ
ЯК МАРКЕРИ МОНІТОРИНГУ ПЕРЕБІГУ ЗАХВОРЮВАННЯ
І РОЗВИТКУ ГЕМАТОЛОГІЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ**

Досліджено морфофункціональний стан клітин крові за хронічного експериментального гепатиту, індукованого інтервальним введенням ацетамінофену, у щурів лінії Вістар із застосуванням гематологічних, морфологічних, біохімічних та статистичних методів. Особливістю перебігу експериментального хронічного гепатиту є розвиток мультифакторної анемії з ретикулоцитозом, лейкопенією на тлі активованих форм лімфоцитів і тромбоцитів, що є морфологічними маркерами хронічного експериментального запалення і додатковими критеріями моніторингу перебігу хронічного експериментального гепатиту та прогнозу розвитку можливих гематологічних ускладнень у дослідженнях нових підходів для лікування цього захворювання.

Ключові слова: хронічний експериментальний гепатит, клітини крові, анемія, лейкоцитарні індекси, гематологічні ускладнення.

Вступ

На сьогодні велика кількість ліків, що використовуються у клінічній практиці, є гепатотоксичними [1]. Постійне навантаження печінки різними хімічними сполуками призводить до хронічного ушкодження її тканини, що, у свою чергу, призводить до змін функціонування організму.

Токсичний гепатит, або гепатит, індукований ліками, є частою причиною гострої печінкової недостатності. Основними причинами розвитку цього стану є або передозування препаратом (показник, що може залежати від дози та шляху введення), або підвищена індивідуальна чутливість до лікарського засобу (ідіосинкразія). Нині з'являється все більше доказів того, що індукований ліками гепатит є імуніоопосередкованим та викликається реактивними метаболітами. Токсичне ураження печінки зазвичай виявляється у вигляді гострого вірусоподібного гепатиту чи холестазу з регресією цього стану при припиненні лікування препаратом. В тяжких випадках єдиним лікуванням є трансплантація печінки. Діагностика лікарсько-асоційованих гепатитів ускладнена через схожість симптоматики з гепатитами іншої етіології [2, 3].

Основними симптомами гепатиту є жовтяниця (жовта шкіра і очі), темна сеча й ахолічні випорожнення. Інші менш специфічні симптоми включають слабкість, нудоту, втрату апетиту, біль у печінці та лихоманку [4].

Пошкодження тканини печінки призводить до вивільнення у кров цитоплазматичних ферментів печінки – аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспартатамінотрансферази (АсАТ), що призводить до підвищення їх активності в сироватці крові, а також зростання концентрації метаболітів гемоглобіну і міоглобіну білірубину, особливо кон'югованого [5].

Ацетамінофен (парацетамол) – препарат, що активно використовується як жарознижувальний і знеболювальний засіб. Головним патогенетичним механізмом є утворення токсичного метаболіту ацетамінофену N-ацетил-p-бензохіноніміну [2]. Зв'язування білків, особливо мембранних і мітохондріальних, призводить до окисного стресу. Підвищення мітохондріальної проникності індукує апоптоз гепатоцитів, а порушення плазматичної і внутрішньоклітинних мембран призводить до вивільнення гідролітичних ферментів і індукції некрозу [1]. Тривале застосування ацетамінофену – до хронічного ураження печінки. Одним із маркерів розвитку запалення є кількісні та морфологічні зміни клітин крові, які не

тільки сприяють ушкодженню різних тканин, а й можуть спричинювати прогресування захворювання внаслідок надмірної активації лейкоцитів і їх накопичення у тканині. Окрім цього, пошкодження клітин крові призводить до розвитку супутніх патологій, наприклад анемії, яка ускладнює перебіг захворювання і обмежує можливість застосування деяких видів терапії [6, 7]. Тому процес постановки діагнозу вимагає комплексного аналізу стану організму та можливості раннього виявлення зони ураження і розвитку супутніх захворювань, а також визначення маркерних критеріїв, наприклад змін з боку кровотворної системи. Таким чином, для відпрацювання оновлених терапевтичних підходів у лікуванні токсичного гепатиту, для яких використовуються експериментальні моделі, є актуальним характеризувати зміни різних систем, до яких належать цитологічні показники крові, як маркерів порушення функціонування організму, ступеня ушкодження і відповіді на терапію.

Численні наукові роботи продемонстрували підтвердження запального процесу, спричиненого ацетамінофеном, на основі біохімічних, мікроскопічних та гістологічних даних [2, 3]. Однак комплексного аналізу щодо змін морфо-функціональних характеристик клітин крові при відтворенні експериментальної моделі хронічного ураження печінки цим препаратом не проведено, тому доцільно поглибити існуючі відомості новими експериментально отриманими даними.

Мета роботи

Визначити морфо-функціональний стан клітин крові щурів за розвитку експериментального хронічного гепатиту як маркерів розвитку і перебігу патологічного процесу, а також розвитку супутніх гематологічних ускладнень.

Матеріали та методи

За експериментальну модель обрано щурів лінії Wistar. Тварини були розділені на дві групи: I – контрольна (n = 9), II – група щурів із хронічним експериментальним токсичним гепатитом (n = 7). Моделювали хронічний гепатит п'ятиразовим введенням ацетамінофену дозою 1000 мг/кг, попередньо розчиненого в 0,5 мл соняшникової олії, перорально протягом чотирьох тижнів. Контрольна група одержувала відповідний об'єм соняшникової олії. Збір крові здійснювали після

евтаназії щурів CO₂ із пахової вени після 24 год від останнього введення препарату.

У ході роботи було застосовано гематологічні, морфологічні, біохімічні та статистичні методи.

Підрахунок кількості формених елементів крові здійснювали в камері Горяєва. Рахували лейкоцити в 100 великих квадратах при малому збільшенні (окуляр *10, об'єктив *8) у затемненому полі зору при опущеному конденсорі. Кількість еритроцитів підраховували у 5 великих квадратах, що розділені на 16 малих, тромбоцитів – у 25 великих квадратах. Визначення кількості клітин у мл крові здійснювали із застосуванням формул для розрахунку кількості лейкоцитів, еритроцитів і тромбоцитів, відповідно [8].

Для підрахунку лейкограми виготовляли мазки крові та фарбували за методом Романовського – Гімза. Ідентифікували клітини за морфологічними ознаками. Проводили підрахунок 200 лейкоцитів з подальшим розрахунком їхнього відсоткового й абсолютного вмісту [8].

Кількість ретикулоцитів підраховували в мазках крові, зафарбованих за суправітальним методом діамантовим крезиловим синім. Підрахунок ретикулоцитів здійснювали на 1000 еритроцитів з використанням імерсійного об'єктива і подальшим визначенням їхнього абсолютного вмісту [8].

Концентрацію гемоглобіну визначали цянметгеміглобіновим методом із застосуванням фотоелектроколориметра КФК-3. Метод ґрунтується на тому, що залісосиньородистий калій окиснює залізо гемоглобіну з утворенням речовини геміглобіну (метгемоглобін), що, у свою чергу, утворює з ацетонціангідринном забарвлену речовину – геміглобінціанід, інтенсивність забарвлення якого прямо пропорційна концентрації гемоглобіну. Фотометрували за довжини хвилі 540 нм (зелений світлофільтр) проти трансформуючого розчину. Концентрацію гемоглобіну (г/л крові) визначали за формулою відносно показника контрольної проби з концентрацією гемоглобіну 150 г/л [8].

Метод визначення гематокритної величини заснований на розділенні плазми й еритроцитів після центрифугування крові з антикоагулянтом ЕДТА. Для цього використовували тонкі скляні мікрокапіляри. Гематокритну величину визначали за відношенням довжини осаду еритроцитів до довжини крові у мікрокапілярі [8].

Визначали активність АлАТ і АсАТ у сироватці крові щурів за методом Райтмана – Френкеля. Метод базується на амінуванні 2-оксоглутарової кислоти L-аланіном (для АлАТ) або L-аспарагіновою кислотою (для АсАТ) під дією аланінаміотрансферази (АлАт) чи аспартатаміотрансферази (АсАТ), відповідно. В результаті реа-

кції утворюються L-глутамінова та піровиноградна кислоти (у випадку амінування під дією АсАТ утворюється щавелевооцтова кислота, що самостійно декарбоксилюється з утворенням піровиноградної кислоти). Вимірювання активності ґрунтується на визначенні оптичної щільності (ОЩ) 2,4-дінітрофенілгідразонів 2-оксоглутарової та піровиноградної кислот у лужному середовищі. Спостерігали прямо пропорційну залежність між ОЩ розчину та активністю ферменту. Для вимірювання ОЩ застосовано фотоелектроколориметр. Вимірювали за довжини хвилі 540 нм. Активність ферментів у сироватці визначали за побудованими калібрувальними графіками [9].

За методом Ендрашика визначали загальний та прямий білірубін у сироватці крові щурів. Метод ґрунтується на утворенні азобілірубіну рожевого кольору в реакції між діазотовою сульфаниловою кислотою та непрямим і прямим білірубіном за присутності кофеїнового реактиву. Концентрація загального білірубіну в пробі прямо пропорційна інтенсивності забарвлення дослідного розчину. За відсутності кофеїнового реактиву до реакції вступає лише прямий білірубін. Концентрацію непрямого білірубіну визначають за різницею між загальним та прямим білірубіном. Для вимірювання ОЩ використано фотоелектроколориметр, вимірювання проводили за довжини хвилі 540 нм. Розрахунок концентрації білірубіну виконали за калібрувальним графіком [10].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми SPSS Statistics 17.0 на базі ОС Windows. Порівнювали показники контрольної та експериментальної груп.

Результати та їх обговорення

1. Визначення маркерів пошкодження печінки

Послідовне багаторазове введення ацетамінофену дозою 1000 мг/кг спричиняє ураження тканини печінки у щурів. Це призводить до підвищення активності АлАТ та АсАТ у сироватці крові, що є біохімічними маркерами пошкодження печінки. Водночас зростає загальний білірубін, особливо прямий, який демонструє пошкодження саме паренхіми цього органу. Наявні морфологічні зміни тканини печінки поряд зі зміною активності вказаних вище ферментів та концентрації білірубіну свідчать про розвиток хронічного гепатиту, що проілюстровано в дослідженні Кузнецової Г. М. та співавторів [11]. Ці результати підтверджуються і нашими дослідженнями: зростання активності АлАТ на 40,45 % (p < 0,001, рис. 1.1а), АсАТ – на 27,13 % (p = 0,001, рис. 1.1b), загального білірубіну – на 71,6 % (p < 0,001, рис. 1.1c) та прямого білірубіну в крові – на 67 % (p < 0,001, рис. 1.1c).

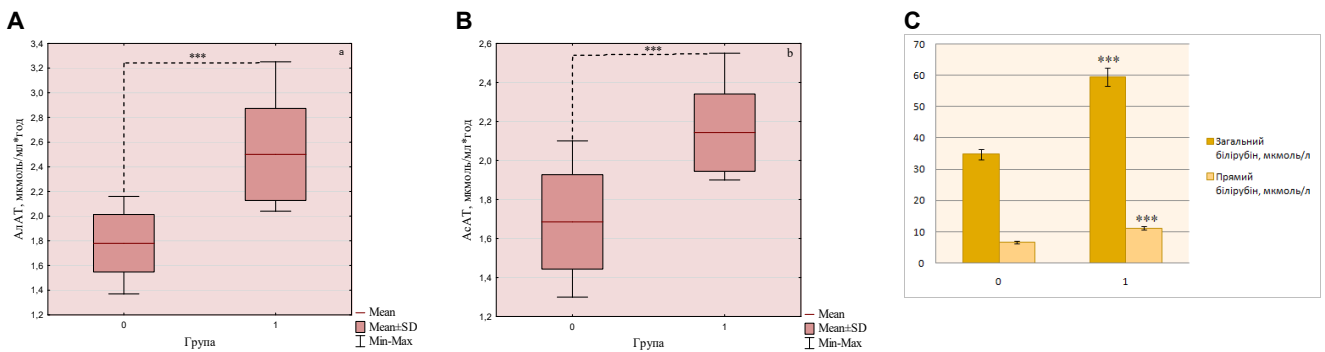


Рис. 1.1. Біохімічні показники сироватки крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1): А – АлАТ, В – АсАТ, С – загальний та прямий білірубін

2. Морфо-функціональний стан еритроцитів крові при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном

За розвитку хронічного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, виявлено зниження кількості еритроцитів у крові на 11 % у експериментальній групі порівняно з групою контролю ($p < 0,001$, рис. 2.1а). Отримані результати можуть бути спричинені патогенетичним впливом метаболіту ацетамінофену N-ацетил-р-бензохіноніміну (NAPQI), який викликає перекисне окиснення ліпідів мембрани еритроцитів та зниження активності антиоксидантних ферментів [12], що призводить до окисного стресу та загибелі червоних клітин крові. Порушення осмотичної стабільності еритроцитів призводить до гемолізу, про що свідчить вихід Hb у кров. Це підтверджується збільшенням рівня непрямого білірубину в крові щурів ($p = 0,002$). До того ж у мазках крові виявлено збільшення кількості поліхроматофільних еритроцитів (які фарбуються як кислими, так і основними барвниками), що є характерною ознакою при гемолітичних анеміях та відображає вихід незрілих еритроцитів у кров із кісткового мозку (КМ) і активацію його регенераторної активності. Спостерігалася поява ехіноцитів – еритроцитів, поверхня яких має багато зубців (рис. 2.2).

Причиною зростання таких форм є передчасне старіння еритроцитів. До того ж виявлення ехіноцитів свідчить про низький вміст АТФ у клітинах та порушення ліпідно-кислотного складу плазми. Застосовано кореляційний аналіз за Спірменом і встановлено залежність між кількістю еритроцитів у крові та концентрацією білірубину у сироватці крові. Встановлено, що кількість еритроцитів у крові має обернений кореляційний зв'язок середньої сили з рівнем прямого білірубину в сироватці крові ($r = -0,6$; $p < 0,05$), тому може служити додатковим критерієм розвитку гематологічних ускладнень токсичного гепатиту.

Водночас за хронічного токсичного гепатиту в експериментальній групі виявлено зниження концентрації гемоглобіну на 8 % порівняно із групою контролю ($p = 0,001$, рис. 2.1б). Отримані результати можуть бути спричинені як зменшенням кількості еритроцитів у крові, так і порушенням метаболізму заліза, опосередкованого медіаторами запалення, наприклад білком гепсидином. Концентрація останнього підвищується під час хронічних запалень внаслідок активації експресії IL-6. Таким чином, гепсидин блокує всмоктування заліза в дуоденальному відділі кишечника та перешкоджає вивільненню заліза із макрофагів, у яких він накопичується [13, 14].

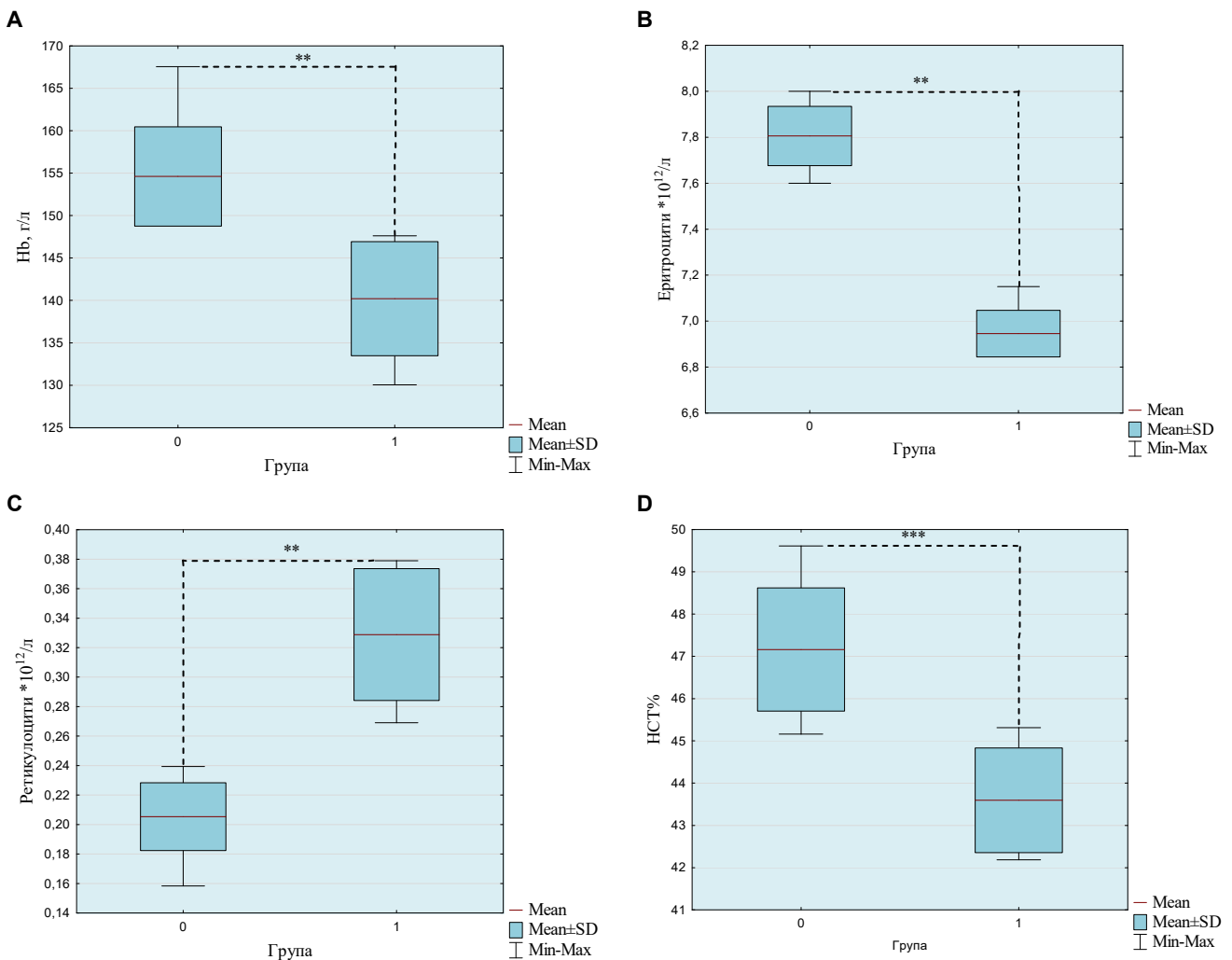


Рис. 2.1. Еритроцитарні показники крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1): А – кількість еритроцитів, В – концентрація гемоглобіну, С – гематокрит, D – кількість ретикулоцитів

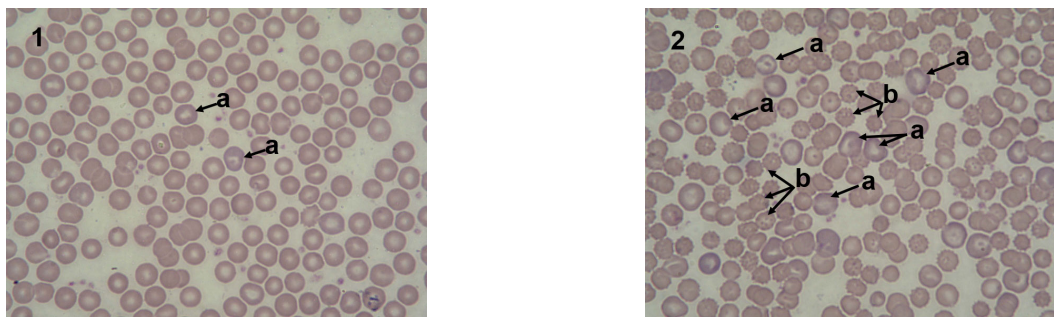


Рис. 2.2. Мікрофотографії мазків крові щурів у нормі (1) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (2): а – Поліхроматофільні еритроцити; б – ехіноцити. Анізо- і пойкилоцитоз еритроцитів (забарвлення за методом Романовського – Гімза; Об.×40,Ок.×10)

Водночас зменшення кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну супроводжується зниженням гематокриту на 7,6 % в експериментальній групі проти контролю ($p < 0,001$, рис. 2.1с).

Дослідження еритроцитарних індексів, які відображають функціональну повноцінність еритроцитів, їхню зрілість і повноцінність диференціювання, свідчить, що середній вміст (MCH) і середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC) не зазнають суттєвих змін ($p = 0,344$; $p = 0,27$, відповідно; рис. 2.3а, в). Виявлено зростання середнього об'єму еритроцитів MCV

($p = 0,02$, рис. 2.3с), що пов'язане зі зростанням кількості молодих еритроцитів-поліхроматофілів, які мають більший об'єм порівняно зі зрілими еритроцитами (рис. 2.2), а їх поява є характерним механізмом компенсації гемолізу. Одним із механізмів появи макроцитів у крові є порушення синтезу нуклеїнових кислот і дозрівання ядер попередників еритроцитів у кістковому мозку. Встановлено, що деякі ліки здатні викликати мегалобластні зміни, обмежуючи всмоктування вітамінів чи їх метаболізм або інгібуючи синтез нуклеотидів чи білків за допомогою інших механізмів [15].

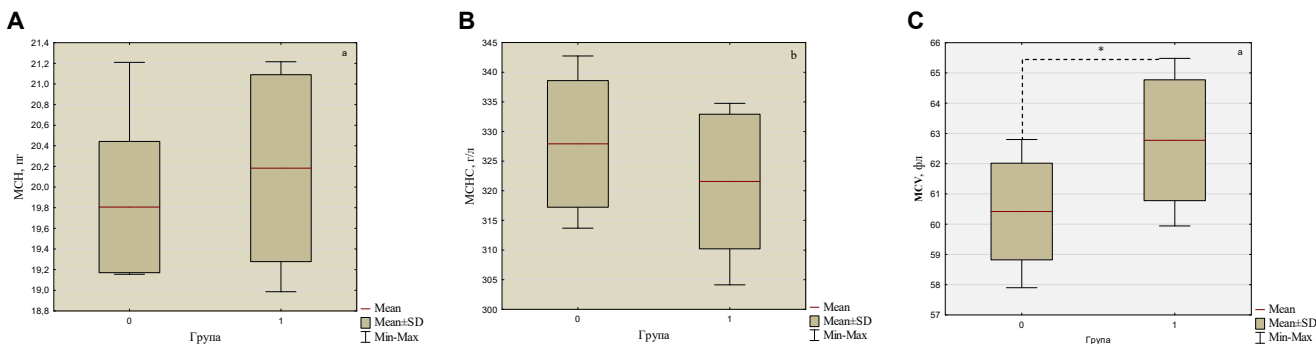


Рис. 2.3. Еритроцитарні індекси крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1): А – середній вміст гемоглобіну в еритроциті (MCH); В – середня концентрація гемоглобіну в еритроциті (MCHC); С – середній об'єм еритроцита (MCV)

На тлі зменшення кількості еритроцитів у крові виявлено істотне зростання абсолютної кількості ретикулоцитів на 31,7 % за розвитку хронічного гепатиту ($p = 0,003$, див. рис. 2.1d). На мікрофотографіях мазків крові щурів після суправітального забарвлення продемонстровано збільшення кількості ретикулоцитів після застосування ацетамінофену (рис. 2.4). Такі результати відображають активацію еритропоезу в КМ для відновлення кількості еритроцитів і компенсації анемії, що розвинулася. Одержані результати узгоджуються зі

зростанням кількості поліхроматофільних еритроцитів, виявленим при аналізі мазків крові, забарвлених за методом Романовського – Гімза (рис. 2.2), а також зростанням MCV на 4 % за розвитку хронічного гепатиту ($p = 0,02$, рис. 2.3с), що підтверджує збагачення крові молодими еритроцитами. Ретикулоцитоз характерний для розвитку гемолітичної анемії. Унаслідок цього в крові з'являються макроретикулоцити [16], що супроводжується зростанням середнього об'єму еритроцитів.

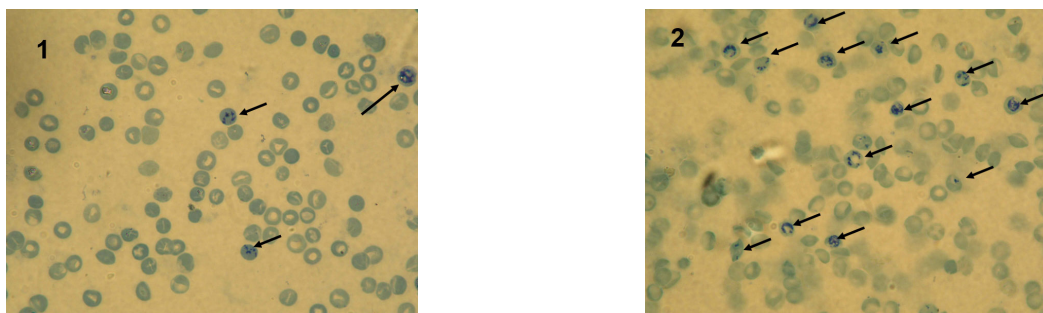


Рис. 2.4. Мікрофотографії мазків крові щурів у нормі (1) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (2). Стрілками вказані ретикулоцити (суправітальне забарвлення діамантовим крезильовим синім. Об.×100, Ок.×10, імерсія)

Отже, за хронічного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, у щурів експериментальної групи спостерігаються ознаки комплексної мультифакторної анемії гемолітичного характеру й анемії, асоційованої із запаленням, про що свідчить зниження кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну у крові. Зростання кількості ретикулоцитів підтверджує активацію відновних процесів, а саме еритропоезу, на тлі гемолітичних явищ. Збільшення середнього об'єму еритроцитів пов'язане з активним утворенням ретикулоцитів, які мають більші розміри, і є додатковою ознакою активації відновних процесів разом з ретикулоцитозом і поліхромазією.

3. Морфо-функціональний стан лейкоцитів крові при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном

За розвитку хронічного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, показано зменшення кількості лейкоцитів у крові на 27,5 % в експериментальній групі порівняно з групою контролю ($p < 0,001$, рис. 3.1). Встановлено, що кількість лейкоцитів у крові має обернений кореляційний зв'язок середньої сили з активністю АлАТ ($r = -0,56$) та концентрацією білірубіну ($r = -0,62$) у сироватці крові, що свідчить про залежність рівня лейкопенії і рівня ушкодження печінки і пов'язано з їх активною міграцією до ушкодженої тканини (узгоджується з результатами гістологічного аналізу печінки [11]), а тому є маркером перебігу патологічного процесу.

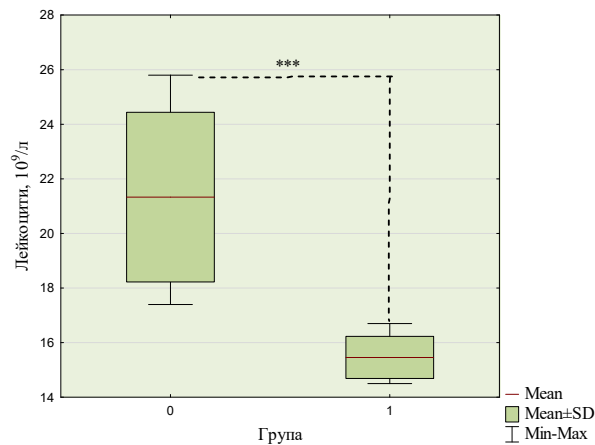


Рис. 3.1. Загальна кількість лейкоцитів у крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1)

У нормі в крові щурів найбільшою популяцією лейкоцитів є лімфоцити (рис. 3.2d1, 3.3.1, 3.4.1). Аналіз розподілу лейкоцитів у крові свідчить про незначне зростання відносної кількості еозинофільних гранулоцитів (28,6 %) за розвитку експериментального хронічного гепатиту ($p > 0,05$, рис. 3.1a). Еозинофілія (рис. 3.3) часто супроводжує хронічні захворювання печінки, під час яких відбувається активація продукції IL-5, що викликає проліферацію та диференціювання попередників еозинофілів у КМ [17]. Водночас зазначається тенденція до зменшення абсолютної кількості еозинофілів у крові (10 %, $p > 0,05$, рис. 3.2a2), що відображає активну міграцію цих клітин у зону ураження.

Аналогічний напрямок змін відбувається з нейтрофільними гранулоцитами: зростає удвічі відносний вміст паличкоядерних форм ($p > 0,05$, рис. 3.2c1) і менш виражено – сегментоядерних форм (6 %, $p > 0,05$, рис. 3.2b1, 3.4) на тлі зменшення їх абсолютного вмісту (36 % і 10,6 %, $p > 0,05$, рис. 3.2b2, c2), що відображає активацію їх утворення в кістковому мозку з активним виходом із крові до зони пошкодження. Нейтрофіли є першою лінією захисту та першими реагують на ушкодження. При запальних процесах печінки нейтрофіли мігрують до її тканини, ініціюючи запальний процес, що включає фагоцитоз, секрецію протеаз, вироблення активних форм кисню тощо. Актива-

ція нейтрофілів при неінфекційному запальному процесі пов'язана зі зростанням концентрацій молекул, які вивільняються у разі пошкодження клітин внаслідок їх некрозу і деградації сполук позаклітинного матриксу. Ці молекули активують макрофаги та інші клітини до вивільнення цитокінів і хемокінів, що й запускають активацію утворення нейтрофілів [18].

Найбільших змін за розвитку хронічного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, зазнають лімфоцити крові. На тлі тенденції до зниження відносної кількості лімфоцитів у крові (5 %, $p > 0,05$, рис. 3.2d1) істотно зменшується їх абсолютний вміст на 31,7 % у експериментальній групі ($p = 0,001$, рис. 3.2d2). Такі результати вказують на активне рекрутування лімфоцитів через синусоїдальний ендотелій із крові, а їх затримка у тканині печінки призводить до стійкого хронічного запалення. Ці твердження узгоджуються з результатами гістологічних досліджень [11]. Т-клітини виявляються в зонах апоптичних гепатоцитів [19].

Клітинна імунна відповідь включає активацію антиген-специфічних Т-лімфоцитів з подальшою клітинною цитотоксичністю [20]. В-лімфоцити залучені до регенерації ушкодженої тканини через активацію проліферації M2-макрофагів, які активують регенераційні процеси в тканині [21].

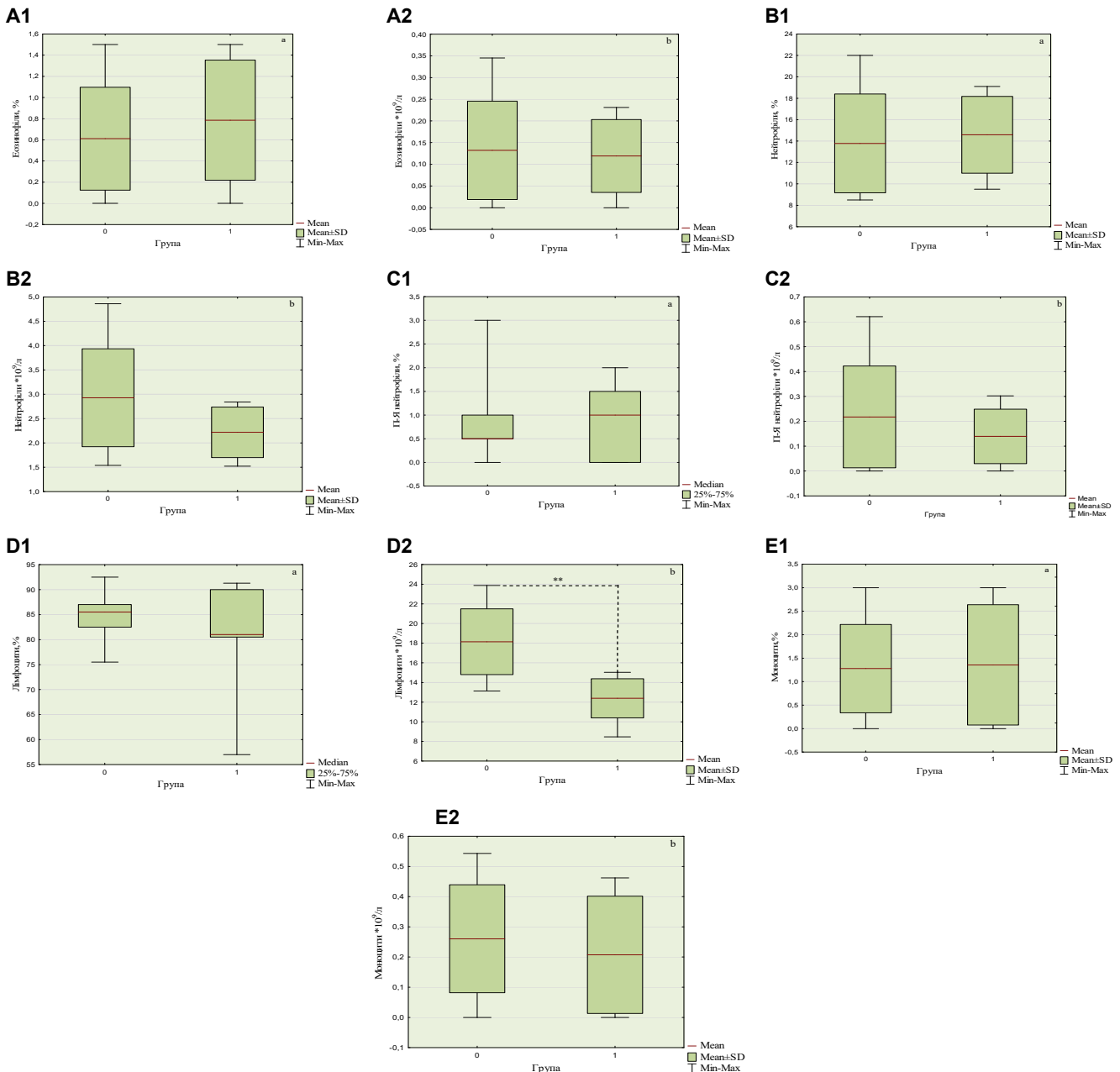


Рис. 3.2. Лейкоцити крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1): 1 – відносний вміст, 2 – абсолютна кількість: А1-2 – еозинofilів, В1-2 – нейтрофілів, С1-2 – паличкоядерні (П/я) нейтрофілів, D1-2 – лімфоцитів, E1-2 – моноцитів

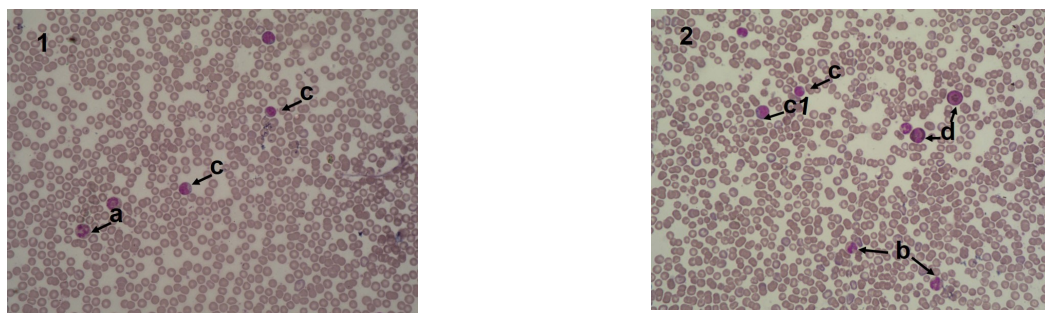


Рис. 3.3. Мікрофотографія мазків крові щурів у нормі (1) та при хронічному гепатиті, гепатиті, індукованому ацетамінофеном (2): а – сегментоядерні нейтрофіли; б – паличкоядерні нейтрофіли; с – лімфоцити, с1 – активовані лімфоцити; д – еозинofilі (забарвлення за методом Романовського – Гімза; Об.×40,Ок.×10)

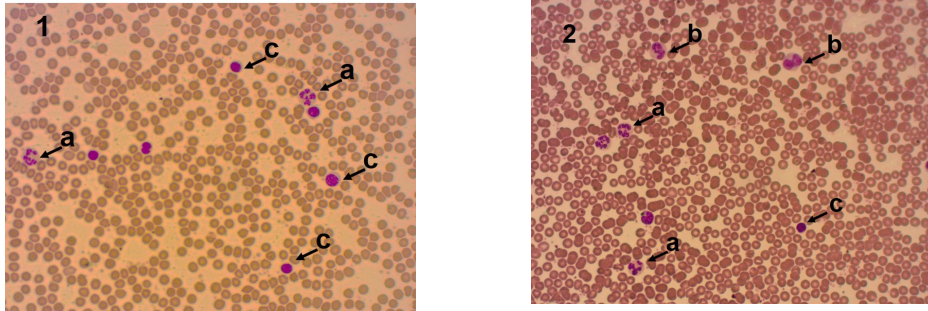


Рис. 3.4. Мікрофотографія мазків крові щурів у нормі (1) та при хронічному гепатиті (2): а – сегментоядерні, б – паличкоядерні нейтрофіли, с – лімфоцити (забарвлення за методом Романовського – Гімза; Об.*40,Ок.*10)

Поряд із цим ушкодження тканини печінки призводить до активації лімфоцитів, що супроводжується появою імунобластів у крові – великих активованих лімфоцитів (рис. 3.5). Морфологічно це великі клітини (15–18 мкм) з високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, еухроматичним ядром, у якому візуалізуються ядерця, і базофільною цитоплазмою. Надалі ці

клітини здатні до інтенсивного поділу та диференціювання у плазматичні чи інші ефекторні клітини, наприклад Т-лімфоцити. Такі процеси відбуваються після відповідного стимулу – антигену, що взаємодіє з поверхневими імуноглобулінами чи рецепторами лімфоцитів. Акумуляція лейкоцитів у тканині печінки показана в попередніх дослідженнях [11, 19].

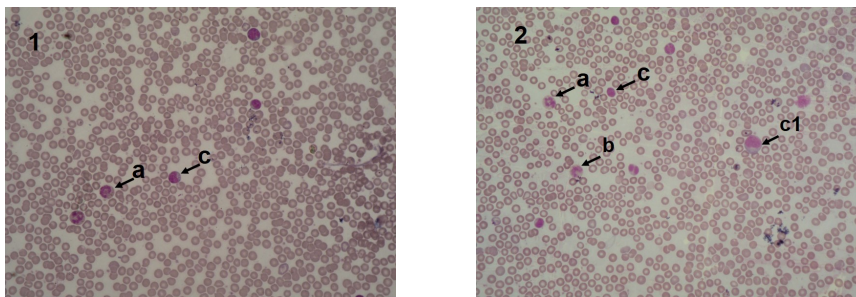


Рис. 3.5. Мікрофотографії мазків крові щурів у нормі (1) та при хронічному гепатиті, гепатиті, індукованому ацетамінофеном (2): а – сегментоядерні нейтрофіли; б – паличкоядерні нейтрофіли; с – лімфоцити, с1 – активовані лімфоцити (забарвлення за методом Романовського – Гімза; Об.*40,Ок.*10)

До розвитку хронічного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, залучаються моноцити, відносна кількість яких зростає (6,2 %, $p > 0,05$, див. рис. 3.2e1), водночас абсолютний вміст знижується у крові щурів у експериментальній групі (21 %, $p > 0,05$, рис. 3.2e2). Як наслідок пошкодження тканини, клітини Купфера, гепатоцити та зірчасті клітини виділяють хемокіни, такі як CCL2, які провакують масивну інфільтрацію моноцитами печінки, що розширюють пул макрофагів. До того ж макрофаги захищають печінку від токсичного заліза при гемолітичній анемії, поглинаючи старіючі та пошкоджені еритроцити [22].

Аналіз морфологічних форм лімфоцитів експериментальної групи проти контрольної свідчить про зменшення малих форм (15,6 %, $p > 0,05$) на тлі зростання

кількості середніх (9 %, $p > 0,05$) і великих лімфоцитів (42 %, $p > 0,05$, рис. 3.6). Малі лімфоцити є наївними клітинами, що надійшли в периферичну кров та готові до сприйняття стимулів. Їх зменшення свідчить про активну міграцію лімфоцитів із крові до ушкодженої тканини. Це підтверджується зниженням відносної та абсолютної кількості лімфоцитів. Середні лімфоцити відповідають за здійснення імунітету, а великі (імунобласти) – готові до поділу клітини, що можуть диференціюватися як у плазматичні клітини, так і в активовані Т-лімфоцити, залежно від стимулюючого фактора. Збільшення відносного вмісту середніх та великих форм підтверджує активацію імунних клітин внаслідок розвитку патологічного процесу в організмі.

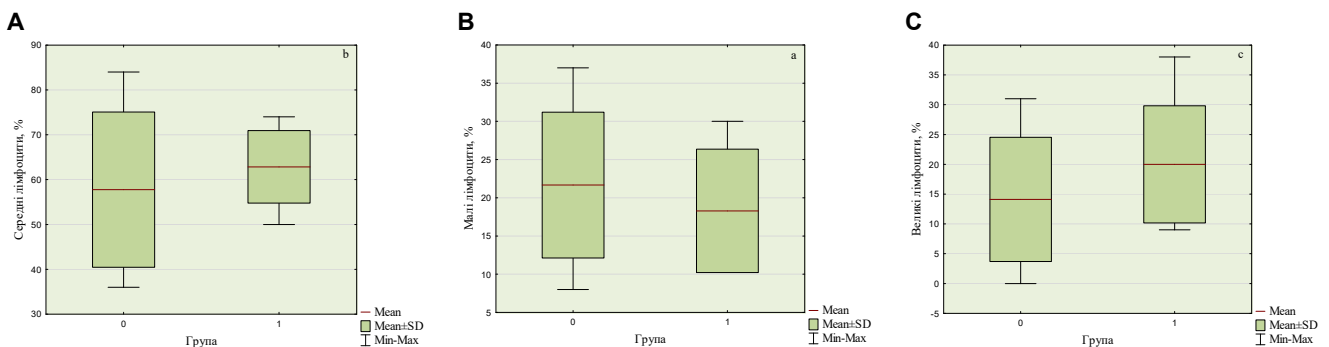


Рис. 3.6. Відносна кількість малих (А), середніх (В) та великих (С) лімфоцитів у крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1)

Отже, за хронічного токсичного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, у щурів виявлені ознаки запалення, про що свідчить активна участь лейкоцитів у розвитку патологічного процесу у тканині печінки. Істотне зменшення лейкоцитів, а особливо лімфоцитів, свідчить про активне рекрутування імунних клітин до тканини печінки з наступною її інфільтрацією. Підвищення кількості середніх і великих лімфоцитів свідчить про їх активацію та участь у запаленні внаслідок uszkodження клітин печінки та вивільнення у кров сигнальних молекул. Зростаюча тенденція до зменшення абсолютної кількості моноцитів свідчить про залучення клітин до регуляції імунної відповіді, фагоцитування зруйнованих чи апоптичних гепатоцитів і нейтралізації токсичного впливу заліза, що вивільняється з еритроцитів, які активно піддаються гемолізу.

4. Морфо-функціональний стан тромбоцитів крові при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном

Встановлено, що за хронічного токсичного гепатиту, індукованого ацетамінофеном, кількість тромбоцитів у крові знижується на 21,7 % у експериментальній групі порівняно з контролем ($p = 0,002$, рис. 4.1). Такі зміни можуть бути пов'язані із пригніченням тромбопоєзу в КМ внаслідок зниження синтезу тромбопоєтину як гемопоетичного фактора росту тромбоцитів через uszkodження клітин печінки. Поряд із цим спостерігається підвищена секвестрація тромбоцитів у зоні пошкоджен-

ня та в селезінці, яка збільшується при розглядуваному захворюванні [23]. Також імовірним механізмом руйнування тромбоцитів є наявність лікарсько-залежних антитіл. Це твердження ґрунтується на результатах дослідження Bougie D. W. та співавторів [24]. Аналіз морфо-функціонального стану тромбоцитів у мазках крові підтверджує зростання кількості як дегранульованих форм, так і гігантських тромбоцитів, що свідчить про зростання їх оновлення і активації в зоні патологічного процесу. Дегрануляція сприяє вивільненню вмісту тромбоцитарних гранул у позаклітинний простір. Ці компоненти не тільки впливають на гемостаз, реологічні властивості крові, але й на перебіг запальних реакцій, звуження судин. Наприклад, тромбоцитарні викликає хемотаксис лейкоцитів та фібробластів у місця загоєння травм. У дослідженні, що було проведено Kuwano A. зі співавторами, продемонстровано зниження рівня uszkodження печінки (знижувались активність АлАТ, концентрація білірубину, зменшувались площа некрозу печінки та відкладення фібрину), індукованого ацетамінофеном, при введенні мишам рекомбінантного тромбоцитарного фактора [25]. В наших дослідженнях встановлений зворотний кореляційний зв'язок високої сили між кількістю тромбоцитів у крові та рівнем активності АлАТ ($r = -0,752$, $p < 0.05$) і концентрацією білірубину ($r = -0,767$, $p < 0.05$) у сироватці крові, що може служити критерієм перебігу хронічного гепатиту і розвитку можливих геморагічних ускладнень.

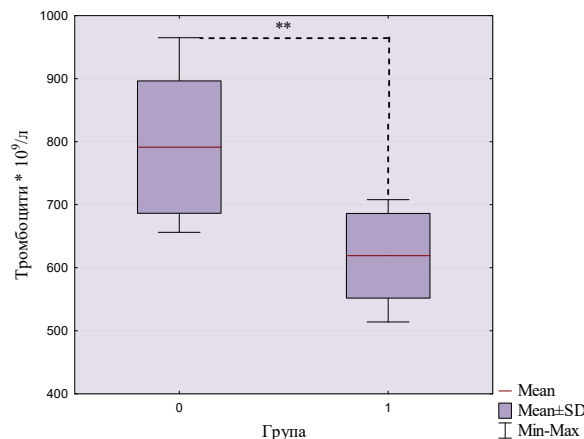


Рис. 4.1. Кількість тромбоцитів у крові щурів у нормі (0) та при хронічному гепатиті, індукованому ацетамінофеном (1)

Отже, на тлі розвитку хронічного гепатиту, викликаного ацетамінофеном, у досліджуваних щурів спостерігається тромбоцитопенія. Можливими причинами розвитку цього ускладнення є підвищена секвестрація тромбоцитів у зоні пошкодження печінки і зниження секреції тромбопоєтину печінкою. Водночас можливе утворення антитіл до тромбоцитів, що спричинено метаболітами ацетамінофену.

4. Роль лейкоцитарних індексів у прогнозуванні захворювання

Для прогнозування перебігу захворювання печінки було обрано такі лейкоцитарні індекси: відношення нейтрофілів до лімфоцитів (NLR), моноцитів до лімфоцитів (MLR), лімфоцитів до моноцитів (LMR), тромбоцитів до лімфоцитів (PLR). Діагностичне значення цих гематологічних індексів використовується для прогнозування і моніторингу перебігу захворювання та відповіді на терапію. Їх значення використовуються у визначенні стадії хвороби пацієнта [26] (табл. 4.1).

Таблиця 4.1. Прогностичні запальні маркери крові

Маркер	Значення показника контрольної групи	Значення показника експериментальної групи
NLR	0,13	0,22*
MLR	0,014	0,02
LMR	69,5	59,9
PLR	43,6	53,7*

* $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Встановлено підвищення лейкоцитарних індексів NLR, MLR та PLR. Відомо, що перші два індекси відповідно корелюють із підвищеним ризиком смертності пацієнтів внаслідок прогресування запалення, а також можливий перехід хвороби у форму цирозу чи гепатоцелюлярної карциноми. PLR є маркером системних запальних реакцій організму. Також зазначено, що пацієнти з нижчим значенням NLR та PLR перед лікуванням мають більш тривалий термін виживання [26]. Водночас зазначено зниження індексу LMR. Отримані результати можуть вказувати на несприятливий прогноз виживання за розвитку гепатиту. Таке твердження ґрунтується на результатах дослідження Zhu S. зі співавторами [27].

Висновки

Результати проведення експериментальної роботи дозволили встановити комплекс змін морфо-функціонального стану клітин крові як маркерів перебігу захворювання.

1. Багаторазове введення ацетамінофену спричиняє підвищення активності АлАТ, АсАТ та концентрації білірубину, що свідчить про розвиток цитолітичного пошкодження печінки.

2. Індуковане ацетамінофеном хронічне пошкодження тканини печінки супроводжується розвитком мультифакторної анемії, яка асоційована із запаленням і гемолізом еритроцитів, що підтверджується зниженням концентрації гемоглобіну та кількості еритроцитів у крові. Виразений ретикулоцитоз у крові відображає активацію репаративних процесів у кістковому мозку.

3. Показано залученість лейкоцитів до розвитку хронічного гепатиту, індукованого ацетамінофеном. Тенденція до зростання відносної кількості еозинофілів, паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів, моноцитів і зниження лімфоцитів у крові на тлі зниження загальної кількості лейкоцитів підтверджує рекрутування цих клітин до тканини печінки, що ініціює та підтримує запальний процес.

Водночас виявлено перерозподіл морфологічних груп лімфоцитів. Зростання кількості середніх та великих лімфоцитів свідчить про активацію імунних клітин наявними у крові прозапальними молекулами, що вивільняються гепатоцитами й активованими лейкоцитами та макрофагами.

4. Зазначено розвиток тромбоцитопенії як наслідок розвитку хронічного запалення тканини печінки, що негативно впливає на синтез тромбоектину – головного фактора проліферації і диференціації тромбоцитарних попередників у кістковому мозку.

5. Виявлений комплекс змін клітин крові (зниження кількості еритроцитів і гематокриту, концентрації гемоглобіну на тлі ретикулоцитозу, лейкопенія та тромбоцитопенія) є маркерами хронічного гепатиту і розвитку супутніх патологій. Встановлене зростання лейкоцитарних індексів NLR, MLR, PLR та зниження MLR за розглядуваної патології відображають прогресування запалення і є критеріями подальшого несприятливого прогнозу перебігу захворювання та зниження виживання.

Отримані дані є характерними як для експериментального гепатиту, так і для гепатиту в людей, тому можуть бути критеріями моніторингу перебігу хронічного гепатиту й оцінювання ефективності при розробці нових підходів лікування цього захворювання.

Отже, ацетамінофен є потенційно гепатотоксичною речовиною, призначення та застосування якої слід контролювати за біохімічними і гематологічними показниками з метою передбачення розвитку зазначених патологічних ускладнень.

Список використаних джерел

1. Ortega-Alonso A. Chronic liver injury induced by drugs and toxins / A. Ortega-Alonso // *Journal of Digestive Diseases*. – 2018. – Vol. 19, № 9. – P. 514–521. – doi:10.1111/1751-2980.12612.
2. McGill M. R. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis / M. R. McGill // *Pharmaceutical Research*. – 2013. – Vol. 30, № 9. – P. 2174–2187. – doi:10.1007/s11095-013-1007-6.
3. Drug-induced liver injury / R. J. Andrade, N. Chalasani, E. S. Björnsson et al. // *Nature Reviews Disease Primers*. – 2019. – Vol. 5, № 1. – P. 58. – doi:10.1038/s41572-019-0105-0.
4. Utrecht J. Mechanisms of idiosyncratic drug-induced liver injury / J. Utrecht // *Advances in Pharmacology*. – 2019. – Vol. 85. – P. 133–163. – doi:10.1016/bs.apha.2018.12.001.
5. Kwo P. Y. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries / P. Y. Kwo, S. M. Cohen, J. K. Lim // *American Journal of Gastroenterology*. – 2017. – Vol. 112, № 1. – P. 18–35. – doi:10.1038/ajg.2016.517.
6. Мезенхімальні стовбурові клітини та клітини-попередники кісткового мозку щурів в умовах хронічної дії іонізуючої радіації / І. Руссу, Н. Родіонова, Д. Білько, Н. Білько // *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. – 2017. – Вип. 22. – С. 224–230. – http://radiationproblems.org.ua/22_2017/NCRM_2017_17.pdf
7. Оцінка радіопротекторної дії меланінових пігментів базидіоміцетів на гемопоетичну систему мишей Balb/C при опроміненні іонізуючою радіацією у сублетальній дозі / Д. І. Білько, І. З. Руссу, Н. М. Білько // *Проблеми радіаційної медицини та радіобіології*. – 2019. – Вип. 24. – С. 210–219. – <http://doi.org/10.33145/2304-8336-2019-24-210-219>
8. Цитологічна і лабораторна техніка та діагностика: навч. посіб. / А. В. Воробель та ін. // ДВНЗ "Прикарпат. нац. ун-т ім. Василя Стефаника". – Івано-Франківськ: Вид-во "Плай", 2013.
9. Філісіт. Інструкція до набору реактивів для визначення активності алінінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази у сироватці крові (метод Райтмана – Френкеля). – 2012. – <http://felicit.com.ua>.
10. Філісіт № 2012. Інструкція до набору реактивів для визначення загального та прямого білірубину в сироватці крові (за методом Ендрашика). – 2012. – <http://felicit.com.ua>.
11. Water-soluble pristine C₆₀ fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury / H. Kuznietsova, O. Lynchak, N. Dziubenko et al. // *Biolimpacts: Bl*. – 2019. – Vol. 9, № 4. – P. 227–237. – <https://doi.org/10.15171/bl.2019.28>.
12. Swem T. F. Effect of hydro-methanol stem bark extract of *Burkea africana* on erythrocyte osmotic fragility and haematological parameters in acetaminophen-poisoned rats / T. F. Swem, P. E. Aba, S. C. Udem // *Clinical Phytoscience*. – 2020. – Vol. 6, № 65. – P. 1–7. – <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00211-x>.
13. Coyne D. W. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target / D. W. Coyne // *Kidney international*. – 2011. – Vol. 80, № 3. – P. 240–244. – <https://doi.org/10.1038/ki.2011.141>.
14. Wang C. Y. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation / C. Y. Wang, J. L. Babbitt // *Current opinion in hematology*. – 2016. – Vol. 23, № 3. – P. 189–197. – <https://doi.org/10.1097/MON.0000000000000236>.
15. Causes of macrocytic anemia among 628 patients: mean corpuscular volumes of 114 and 130 fL as critical markers for categorization / N. Takahashi, J. Kameoka, N. Takahashi et al. // *International Journal of Hematology*. – 2016. – Vol. 104, № 3. – P. 344–357. – doi:10.1007/s12185-016-2043-x.
16. Nagao T. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults / T. Nagao, M. Hirokawa // *Journal of General and Family Medicine*. – 2017. – Vol. 18, № 5. – P. 200–204. – doi:10.1002/jgf2.31.
17. Interleukin-5, № IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity / R. M. Reiman, R. W. Thompson, C. G. Feng et al. // *Infection and Immunity*. – 2006. – Vol. 74, № 3. – P. 1471–1479. – doi:10.1128/IAI.74.3.1471-1479.2006.
18. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury / H. Huang, S. Tohme, A. B. Al-Khafaji et al. // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 62, № 2. – P. 600–614. – doi:10.1002/hep.27841.
19. Kleiner D. E. The histopathological evaluation of drug-induced liver injury / D. E. Kleiner // *Histopathology*. – 2017. – Vol. 70, № 1. – P. 81–93. – doi:10.1111/his.13082.
20. Acute Liver Injury Is Independent of B Cells or Immunoglobulin M. / J. A. Richards, M. Bucsaiova, E. E. Hesketh et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10, № 9. – P. e0138688. – doi:10.1371/journal.pone.0138688.
21. B Cell-Mediated Maintenance of Cluster of Differentiation 169-Positive Cells Is Critical for Liver Regeneration / K. Behnke, Y. Zhuang, H. C. Xu et al. // *Hepatology*. – 2018. – Vol. 68, № 6. – P. 2348–2361. – doi:10.1002/hep.30088.
22. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases / F. Tacke // *Journal of Hepatology*. – 2017. – Vol. 66, № 6. – P. 1300–1312. – doi:10.1016/j.jhep.2017.02.026.
23. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease / O. Mitchell, D. M. Feldman, M. Diakow, S. H. Sigal // *Hepatic medicine: evidence and research*. – 2016. – № 8. – P. 39–50. – doi:10.2147/HMER.S74612.

24. Drug-dependent clearance of human platelets in the NOD/scid mouse by antibodies from patients with drug-induced immune thrombocytopenia / D. W. Bougie, D. Nayak, B. Boylan et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, № 16. – P. 3033–3038. – doi:10.1182/blood-2010-03-277764.
25. Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates acetaminophen-induced liver toxicity in mice / A. Kuwano, M. Kohjima, H. Suzuki et al. // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2019. – Vol. 18, № 2. P. 1323–1330. – doi:10.3892/etm.2019.7665.
26. Mao W. Haematologic indices in hepatitis B virus-related liver disease / W. Mao, J. Wu // *Clinica Chimica Acta*. – 2020. – Vol. 500. – P. 135–142. – doi:10.1016/j.cca.2019.10.007.
27. Lymphocyte-monocyte ratio at admission predicts possible outcomes in patients with acute-on-chronic liver failure / S. Zhu, Y. Waili, X. Qi et al. // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2017. – Vol. 29, № 1. – P. 31–35. – doi:10.1097/MEG.0000000000000767.

References (Scopus)

1. McGill M. R., Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*. 2013; 30(9): 2174-2187. doi:10.1007/s11095-013-1007-6.
2. Andrade R. J., Chalasani N., Björnsson E. S., et al. Drug-induced liver injury. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019; 5(1): 58. doi:10.1038/s41572-019-0105-0
3. Uetrecht J. Mechanisms of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Advances in Pharmacology*. 2019; 85: 133-163. doi:10.1016/bs.apha.2018.12.001.
4. Ortega-Alonso A., Andrade R. J. Chronic liver injury induced by drugs and toxins. *J Dig Dis*. 2018;19(9):514-521. doi:10.1111/1751-2980.12612.
5. Kwo P. Y., Cohen S. M., Lim J. K. ACG Clinical Guideline: Evaluation of Abnormal Liver Chemistries. *American Journal of Gastroenterology*. 2017; 112(1): 18-35. doi:10.1038/ajg.2016.517.
6. Russu I. Z., Rodionova N. K., Bilko D. I., Bilko N. M. Mesenchymal stem and progenitor cells of rats' bone marrow under chronic action of ionizing radiation. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2017; 22: 224-230. http://radiationproblems.org.ua/22_2017/NCRM_2017_17.pdf
7. Bilko D. I., Russu I. Z., Bilko N. M. Assessment Of Radioprotective Action Of Basidiomycotic Melanin Pigments On The Hematopoietic System Of Balb/C Mice Under Exposure To Ionizing Radiation In Sublethal Dose. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2019; 24: 210-219. doi:10.33145/2304-8336-2019-24-210-219
8. Vorobel A., Gritsulyak B., Glodan O., Hallo O. Cytological and laboratory techniques and diagnostics. Tutorial. Ivano-Frankivsk: Play. 2013. 164 p.
9. Felicit. Instructions for a set of reagents for determining the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in blood serum (Reitman-Frenkel method). 2012; <http://felicit.com.ua>.
10. Felicit. Instructions for a set of reagents for the determination of total and direct bilirubin in serum (by Endraschik method). 2012; <http://felicit.com.ua>.
11. Kuznietsova H., Lynchak O., Dziubenko N., Herheliuk T., Prylutskyi Y., Rybalchenko V. & Ritter U. Water-soluble pristine C₆₀ fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *BioImpacts: BI*. 2019; 9(4): 227–237. Available at: <https://doi.org/10.15171/bi.2019.28>.
12. Swem T. F., Aba P. E. & Udem S. C. Effect of hydro-methanol stem bark extract of *Burkea africana* on erythrocyte osmotic fragility and haematological parameters in acetaminophen-poisoned rats. *Clinical Phytoscience*. 2020; 6: 65. <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00211-x>.

13. Coyne D. W. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target. *Kidney international*. 2011; 80(3): 240–244. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.141>.
14. Wang C. Y. & Babitt, J. L. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Current opinion in hematology*. 2016; 23(3): 189–197. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000236>.
15. Takahashi N., Kameoka J., Takahashi N., et al. Causes of macrocytic anemia among 628 patients: mean corpuscular volumes of 114 and 130 fL as critical markers for categorization. *International Journal of Hematology*. 2016; 104(3): 344-357. doi:10.1007/s12185-016-2043-x.
16. Nagao T., Hirokawa M. Diagnosis and treatment of macrocytic anemias in adults. *Journal of General and Family Medicine*. 2017; 18(5): 200-204. doi:10.1002/jgf2.31.
17. Reiman R. M., Thompson R. W., Feng C. G., et al. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and Immunity*. 2006; 74(3): 1471-1479. doi:10.1128/IAI.74.3.1471-1479.2006
18. Huang H., Tohme S., Al-Khafaji A. B., et al. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology*. 2015; 62(2):600-614. doi:10.1002/hep.27841.
19. Kleiner D. E. The histopathological evaluation of drug-induced liver injury. *Histopathology*. 2017; 70(1): 81-93. doi:10.1111/his.13082.
20. Richards J. A., Bucsaiova M., Hesketh E. E., et al. Acute Liver Injury Is Independent of B Cells or Immunoglobulin M. *PLoS One*. 2015; 10(9): e0138688. doi:10.1371/journal.pone.0138688
21. Behnke K., Zhuang Y., Xu H. C., et al. B Cell-Mediated Maintenance of Cluster of Differentiation 169-Positive Cells Is Critical for Liver Regeneration. *Hepatology*. 2018; 68(6): 2348-2361. doi:10.1002/hep.30088
22. Tacke F. Targeting hepatic macrophages to treat liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2017; 66(6): 1300-1312. doi:10.1016/j.jhep.2017.02.026.
23. Mitchell O., Feldman D. M., Diakow M., Sigal S. H. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease. *Hepatic medicine: evidence and research*. 2016; 8: 39-50. doi:10.2147/HMER.S74612.
24. Bougie DW, Nayak D, Boylan B, Newman PJ, Aster RH. Drug-dependent clearance of human platelets in the NOD/scid mouse by antibodies from patients with drug-induced immune thrombocytopenia. *Blood*. 2010; 116(16): 3033-3038. doi:10.1182/blood-2010-03-277764.
25. Kuwano A., Kohjima M., Suzuki H., et al. Recombinant human soluble thrombomodulin ameliorates acetaminophen-induced liver toxicity in mice. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019; 18(2): 1323-1330. doi:10.3892/etm.2019.7665.
26. Mao W., Wu J. Haematologic indices in hepatitis B virus-related liver disease. *Clinica Chimica Acta*. 2020; 500: 135-142. doi:10.1016/j.cca.2019.10.007.
27. Zhu S., Waili Y., Qi X., Chen Y., Lou Y. Lymphocyte-monocyte ratio at admission predicts possible outcomes in patients with acute-on-chronic liver failure. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2017; 29(1): 31-35. doi:10.1097/MEG.0000000000000767.

Надійшла до редколегії 3.03.2022

Отримано виправлений варіант 3.04.2022

Підписано до друку 3.04.2022

Received in the editorial 3.03.2022

Received version on 3.04.2022

Signed in the press on 3.04.2022

T. Stepanova, stud.,
D. Rozhkova, stud.,
I. Byelinska, Dr. Sci.,
N. Dziubenko, PhD,
H. Kuznietsova, PhD
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

CYTOHEMATOLOGICAL CRITERIA OF CHRONIC EXPERIMENTAL HEPATITIS AS MARKERS FOR MONITORING THE COURSE OF THE DISEASE AND THE DEVELOPMENT OF HEMATOLOGICAL COMPLICATIONS

A study was made of the morphological and functional state of blood cells in chronic experimental hepatitis induced by the interval administration of acetaminophen in Wistar rats using hematological, morphological, biochemical and statistical methods. A feature of the course of experimental chronic hepatitis is the development of multifactorial anemia with reticulocytosis, leukopenia against the background of activated forms of lymphocytes and platelets, which are morphological markers of chronic experimental inflammation and are the additional criteria for monitoring the course of disease treatment.

Keywords: chronic experimental hepatitis, blood cells, anemia, leukocyte indices, hematological complications.