

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет біології, географії і екології  
Кафедра біології людини та імунології**

**ВПЛИВ ДОНОРА МОНООКСИДУ КАРБОНУ НА ЗГОРТАЛЬНУ  
ФУНКЦІЮ КРОВІ**

Кваліфікаційна робота (проект)  
на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

Виконала: студентка 211 М групи  
Спеціальності 091 Біологія  
Освітньо-наукової програми Біологія  
Височанська Марія Валеріївна  
Керівник: д.б.н., доц. Бесчасний С.П.  
Рецензент: проф. Ходосовцев О. Є.

Херсон – 2020

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	<b>3</b>
<b>ВСТУП</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ 1. БІОЛОГІЧНА РОЛЬ МОНООКСИДУ КАРБОНУ</b>	<b>8</b>
1.1. Токсичний вплив	8
1.1.1. Специфічні для Нв ефекти	9
1.1.2. Інгібування мітохондрій та вільне радикальне покоління	10
1.1.3. Тромбоцитарні та запальні ефекти	11
1.1.4. Запальні механізми токсичності СО	11
1.1.5. Механізми ішемії мозку	12
1.2. Синтез монооксиду карбону в організмі	13
1.3. Сполуки – донори монооксиду карбону	16
1.3.1. Біологічні властивості донорів монооксиду карбону	18
1.4. Гемокоагуляція – як одна із основних ланок гемостазу	21
1.4.1. Основний механізм коагуляції	21
1.4.2. Ініціація коагуляції	22
1.4.3. Локалізація процесів коагуляції	23
1.4.4. Коагулограма як показник стану організму	34
<b>РОЗДІЛ 2. ОРГАНІЗАЦІЯ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	<b>41</b>
2.1. Організація дослідження	41
2.2. Методи, які використовувалися під час дослідження	42
<b>РОЗДІЛ 3. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	<b>44</b>
<b>ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	
3.1. Кількісні показники попередників тромбоцитів у кістковому мозку під впливом донора монооксид карбону	44
3.1.1. Тромбоцити на периферії під впливом монооксид вуглецю	46
3.2. Вплив монооксиду вуглецю на згортальну функцію крові	49
<b>ВИСНОВКИ</b>	<b>51</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	<b>53</b>
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	

(НО)<sup>-1</sup> – гемоксигеназа;

aPTT – активований частковий тромбопластиновий час;

CORM – карбонільний комплекс металу;

СОХ – цитохром С-оксидаза;

fVIIa – активований фактор VII;

GP – глікопротеїнові-Ib-рецептори;

Hb – гемоглобін;

НСТ – гематокрит;  
НО – оксигеназа.  
Нр – білки гему;  
МАРК – активована мітогеном кіназа;  
МВР – білок мієліну;  
МРО – мієлопероксидаза;  
NMDA – N-метил-d-аспартат;  
NO – оксиду нітрогену;  
NOS – синтаза оксиду нітрогену;  
O<sub>2</sub> – молекула кисню;  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – радикали кисню;  
ODT – оптична доплерівська томографія;  
ONOO – пероксинітрит;  
PAR1 та PAR4 – рецептори протеази 1 та 4;  
PT – протромбіновий час;  
sGC – гуанілатциклаза;  
TAFI – інгібітор тромбінового активатора фібринолізу;  
TF – тканинний фактор;  
vWF – колаген-фактор фон Віллебранда;  
XD – ендотеліальні клітини;  
XIa – сери новий протеазний фактор;  
ХО – ксантинооксидаза;  
АРС – активований білок С;  
АТФ – аденозин трифосфорна кислота;  
АФК – активні форми кисню;  
ДВЗ – дисемінована внутрішньосудинна коагуляція;  
ОКТ – оптична когерентна томографія;  
сGMP – казеїн глікомакропептид;  
СО – монооксид карбону;

цГМФ – гуанозин 3':5' циклічний моно фосфат.

## ВСТУП

***Актуальність дослідження.*** CO - газ без кольору, смаку та запаху [28]. Чадний газ (CO) виникає в біологічних системах головним чином під час деградації гемму, утворюється як продукт окиснення аметенового містка гемму, процес, що каталізований ферментами оксигеназами (HO) [29]. CO відіграє роль важливого медіатора клітинної сигналізації, є парадоксальним явищем і може бути прикладом гормезису (тобто стимулюючий вплив отруйної сполуки за невеликих концентрацій).

CO може переноситися до передбачуваного місця вивільнення як «проліки», а інша речовина може виступати у ролі вектора. Спочатку різноманітні органічні сполуки, включаючи альдегіди, оксалати та органічні кислоти, були запропоновані як вектори для CO. Проте, застосування цих речовин не було реалізовано, оскільки вони мали токсичні властивості. Тоді було запропоновано використовувати неорганічні складні сполуки; у цьому випадку молекула CO зв'язується з йоном металу [9].

Ці сполуки називають CORM (або молекули, що вивільняють оксид вуглецю) складають нову класифіковану групу хімічних сполук, здатних виділяти контрольовану кількість CO в клітини та тканини, щоб викликати пряму біологічну активність [24].

Як відомо, порушення балансу між прокоагулянтами та антикоагулянтами в організмі може призвести до появи протромботичних подій та пов'язаних із цим захворюваності й смертності. Тромбози можуть бути спричинені надлишковою функцією факторів прокоагуляції або неможливістю антикоагулянтних білків пригнічувати реакцію згортання. Ці стани можуть виникати внаслідок фізіологічних змін (наприклад, старіння), спадкових причин, стану набутого захворювання (наприклад, атероматозна хвороба, рак, антифосфоліпідний синдром), лікарських засобів (наприклад, оральної контрацепції) та ятрогенних причин (наприклад, стент для уведення ліків) [37].

Так як, CORMs мають широкий спектр дії, було вирішено дослідити вплив такої сполуки на згортальну функцію крові.

**Мета дослідження** – дослідити вплив донора монооксиду вуглецю на згортальну функцію крові.

**Завдання:**

1. Теоретично обґрунтувати біологічні властивості монооксиду вуглецю та його вплив на біологічні об'єкти.
2. Проаналізувати наукову літературу стосовно процесу згортання крові та його механізми регулювання.
3. Дослідити вплив монооксиду вуглецю на диференціацію тромбоцитів

у кістковому мозку.

4. Визначити кількісні зміни вмісту тромбоцитів у периферичній крові під впливом донора монооксиду вуглецю.

5. З'ясувати вплив CORM-2 на показники протромбінового часу.

**Об'єкт дослідження** – вплив донора монооксиду карбону на згортальну функцію крові

**Предмет дослідження** – дія препарату CORM-2 на процес диференціації та вміст тромбоцитів у червоному кістковому мозку і швидкість згортання периферичної крові лабораторних тварин.

**Методи та методики дослідження** – для досягнення мети дослідження було проведено огляд науково – методичних літературних джерел з тематики дослідження; використали при дослідженні наступні біологічні методи: гістологічний, цитологічний, статистичний.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Одержані результати не були дослідженні раніше, у науці вони можуть стати точкою відштовхування для подальшого дослідження. Вперше показано, що донори монооксиду карбону можуть впливати на загортальну функцію крові.

**Практична значущість дослідження** полягає в тому, що монооксид карбону (точніше сполуки-донори), можуть безпосередньо застосовуватися як нові лікарські засоби, які здатні впливати на згортальну функцію крові.

**Апробація результатів роботи.** Результати дослідження було оприлюднено на XVI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології" [2].

## **РОЗДІЛ 1**

### **БІОЛОГІЧНА РОЛЬ МОНООКСИДУ КАРБОНУ**

#### **1.1. Токсичний вплив**

Газ чадний (CO) є продуктом неповного згоряння палива та речовин на основі вуглецю [15]. З точки зору громадського здоров'я отруєння CO може бути причиною понад 50% смертельних отруєнь у багатьох промислових країнах. Шкідливі наслідки отруєння CO можуть бути більш розповсюдженими через незареєстровані ситуації та затримку неврологічних ефектів, які можуть

бути пов'язані з впливом CO. Хронічні ефекти CO, які є незначними, такі як несприятливий вплив на судинні захворювання, можуть збільшити кількість людей, які перебувають у групі ризику [5]. Очевидна роль CO як важливого медіатора клітинної сигналізації є парадоксальним явищем і може представляти приклад гормезису, тобто сприятливих ефектів при низькій концентрації, але несприятливих ефектів при більш високих концентраціях. Тим не менше, оскільки CO може утворювати ліганди з ділянками заліза (гему) та міді, існує ймовірність метаболічного втручання [33].

Крім того, індукований CO окислювальний стрес відкриває можливість для модуляції шкідливих ефектів CO за допомогою антиоксидантів (як водорозчинних, так і розчинних у ліпідах сполук) та різних факторів, що впливають на зменшення окисного стресу. Однак слід враховувати мікросередовище в деяких ситуаціях, які потенційно можуть створити більше окислення та подальші метаболічні пошкодження, якщо комбінації та концентрації антиоксидантів є неправильними, тобто виникають прооксидантні ефекти [13].

Клінічна картина, що спостерігається у випадку отруєння чадним газом (CO), включає спектр, починаючи від головного болю та запаморочення, закінчуючи комою та смертю (із смертністю від 1 до 3%). Значна кількість пацієнтів, які пережили отруєння CO, страждають на тривалі неврологічні та афективні наслідки. Неврологічний дефіцит не обов'язково корелює з рівнем CO в крові, але, ймовірно, є результатом плейотропного впливу CO на клітинне мітохондріальне дихання, використання клітинної енергії, запалення та генерацію вільних радикалів, особливо в мозку та серці [26]. Довготривалий нейрокогнітивний дефіцит спостерігається у 15–40% пацієнтів, тоді як приблизно у третини пацієнтів внаслідок середнього та важкого ступеню отруєння спостерігається серцева дисфункція, включаючи аритмію, систолічну дисфункцію лівого шлуночка та інфаркт міокарда [10].

Візуалізаційні дослідження виявляють гіперінтенсивність мозкової білої речовини із затримкою постгіпоксичної лейкоенцефалопатії або дифузною



атрофією мозку. Лікування цих пацієнтів вимагає виявлення супутнього прийому наркотиків, особливо при навмисному отруєнні, впливі токсичних газів, пов'язаних з вогнем, та інгаляційних травмах. Звичайна терапія обмежена нормобаричним та гіпербаричним киснем, проте антидотна терапія відсутня. Хоча гіпербаричний кисень значно зменшує постійні неврологічні та афективні наслідки отруєння CO, частина тих, хто вижив, все ще має значну захворюваність. Досягнуто певних успіхів у терапії, спрямованій на подальший запальний та окислювальний ефект отруєння CO. В даний час розробляються нові методи безпосереднього націлювання на токсичну дію CO, такі як засоби, що поглинають CO [26 - 27].

CO - газ без кольору, смаку та запаху. CO зв'язується з гемоглобіном (Hb) у крові з високою спорідненістю, утворюючи COHb. Вплив на рівні, що досягають 10 частин на мільйон CO, може призвести до підвищення рівня COHb приблизно на 2%. Всесвітня організація охорони здоров'я припускає, що рень CO, що перевищує 6 ppm, є потенційно токсичними протягом тривалого періоду часу. Рівень COHb 2% і більше у осіб які не палять та 10% або більше у курців вважається ненормальним і може спричинити симптоми отруєння [26].

**1.1.1. Специфічні для Hb ефекти.** CO з високою спорідненістю зв'язується з багатьма білками, що містять гем. Гемоглобін (Hb) має у 250 разів більшу спорідненість до CO, ніж до кисню. CO конкурує з киснем за зв'язування з Hb і, витісняючи кисень, зменшує здатність до переносу кисню. Зв'язування CO з Hb також стабілізує розслаблений четвертинний стан Hb з високою спорідненістю (відомий як R-стан), збільшуючи спорідненість до кисню в інших місцях в межах тетраметру Hb, і додатково зменшуючи виділення та доставку кисню. Ні клінічна тяжкість, ні клінічне поліпшення стану отруєних пацієнтів безпосередньо не корелює з рівнем COHb у крові або кліренсом COHb [34].

У дослідженнях собак токсичність газу CO, який вводиться при вдиханні, перевищує переливання аналогічної концентрації еритроцитів, що

знають впливу СО. Це свідчить про те, що токсичний ефект СО виникає внаслідок загального впливу пригнічення СО на доставку кисню, а також на зв'язування з клітинними гем-утримуючими білками. На додачу до Нb, СО зв'язується з іншими гем-утримуючими білками, включаючи міоглобін у серці та скелетних м'язах, мітохондріальну цитохром С-оксидазу (СОХ; комплекс IV) та інші [6].

**1.1.2. Інгібування мітохондрій та вільне радикальне покоління.** СО пригнічує дихання мітохондрій, зв'язуючи залізний гем а3 в активному центрі СОХ, ефективно зупиняючи окисне фосфорилування, подібно до ефектів ціаніду та оксиду нітрогену (NO). СОХ має лише в три рази перевагу щодо СО порівняно з O<sub>2</sub>. Таким чином, завдяки конкурентному зв'язуванню O<sub>2</sub> і СО з СОХ, опосередковане СО інгібування мітохондрій є найбільшим у гіпоксичних умовах. Коли інгібується СОХ, окисне фосфорилування сповільнюється, зменшуючи вироблення АТФ у тканинах, таких як мозок або серце. Інші комплекси в електронно-транспортному ланцюзі продовжують переміщати електрони, утворюючи супероксид, що призводить до подальшого пошкодження клітин і тканин [26].

**1.1.3. Тромбоцитарні та запальні ефекти.** Надлишок СО активує тромбоцити шляхом витіснення NO із гемопротейнів тромбоцитів. Витіснений вільний NO може реагувати з супероксидом, утворюючи пероксинітрид, додатково пригнічуючи функцію мітохондрій та посилюючи активацію тромбоцитів. Активовані тромбоцити можуть стимулювати нейтрофіли до дегрануляції та вивільнення мієлопероксидази (МРО). МРО посилює запальний ефект, викликаючи більшу активацію, адгезію та дегрануляцію нейтрофілів [1].

Дослідження спинномозкової рідини хворих, отруєних СО, які страждали відтермінованими неврологічними наслідками, продемонструвало підвищений рівень основного білка мієліну, ніж у тих, хто не мав виражених симптомів через 1 місяць після початкового отруєння. Ці запальні ефекти

тривають довгий час після початкового отруєння CO і, можливо, не залежать від рівня COHb. Запальний каскад, спричинений NO та ROS, сприяє неврологічним та серцевим пошкодженням внаслідок отруєння CO [40].

**1.1.4. Запальні механізми токсичності CO.** CO активує тромбоцити, витісняючи оксид азоту тромбоцитів (NO) з поверхневих гемопротейнів. NO реагує із вільними радикалами кисню ( $O_2^-$ ), утворюючи пероксинітрид ( $ONOO^-$ ), який пригнічує функцію мітохондрій та активує тромбоцити і нейтрофіли. Інгібування мітохондрій призводить до подальшого продукування активних форм кисню (АФК) і викликає вивільнення вільного гему і, як наслідок, збільшення активності гемоксигенази (HO)<sup>-1</sup>, додатково викликаючи окислювальний стрес. HO<sup>-1</sup> розщеплює вільний гем, виробляючи більше ендogenous CO, створюючи локально петлю позитивного зворотного зв'язку [32].

Активовані нейтрофіли дегранулюють і вивільняють мієлопероксидазу (MPO), спричиняючи більшу активацію нейтрофілів, а також адгезію. Протеази, що виділяються з нейтрофілів, можуть окислювати ксантиндегідрогеназу клітин ендотеліальних клітин (XD) до ксантиноксидази (XO), генеруючи АФК, спричиняючи пошкодження клітин, а також перекисне окислення ліпідів, особливо основного білку мієліну (MBP). При перекисному окисленні MBP утворює аддукти, які спричиняють проліферацію лімфоцитів, активацію мікроглії та, зрештою, неврологічну травму. Загальний вплив гіпоксії та вплив токсичності CO безпосередньо на мітохондрії викликають вивільнення глутамату, який активує рецептори N-метил-d-аспартату (NMDA), що в подальшому призводить до неврологічних пошкоджень [30].

*Вивільнення гему та місцеві рівні CO тканин.* Екзогенний вплив CO також може спричинити вироблення CO в тканинах через гем-залежну індукцію гемоксигенази (HO)<sup>-1</sup>. Експозиція CO швидко збільшує рівень цитозольного гему в мозку за допомогою трьох механізмів: (1) зміна синтезу гему, процес, який регулюється CO; (2) вивільнення гему з пошкоджених клітинних білків; та

(3) порушення в мітохондріальному зберіганні гему СО. Індукований гемом стрес регулює  $\text{NO}^{-1}$  протягом 6–24 годин після впливу СО. Окрім підвищеного окисного стресу та клітинного запалення, вільний гем підтримує місцеві рівні СО, коли він метаболізується  $\text{NO}^{-1}$  у білівердин, залізо та СО, додатково сприяючи виробленню СО [29].

**1.1.5. Механізми ішемії мозку.** Зниження подачі кисню та окисне фосфорилування мітохондрій, зумовлене СО, спричиняють ішемічну та аноксичну травму мозку, що призводить до когнітивних дефіцитів у тих, хто вижив. Травма головного мозку внаслідок ішемії може виникнути внаслідок ексцитотоксичності, ацидозу, іонного дисбалансу та деполяризації, окисного стресу, нітративного стресу, запалення та апоптозу [15]. Великий внутрішньоклітинний приплив кальцію внаслідок інактивації плазматичної мембрани  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази, що виникає внаслідок зниження окисного фосфорилування та зменшення синтезу АТФ, посилює травмування мозку. Зниження рівня АТФ активує внутрішньоклітинні протеази та ліпази, які спричиняють деполяризацію мітохондріальних мембран, загибель клітин та вивільнення нейромедіаторів, зокрема глутамату [27]. Підвищення вивільнення глутамату та утворення гідроксильних радикалів, відповідальних за ішемічну травму мозку, спостерігалось під час та безпосередньо після гіпоксії СО у щурів. Глутамат активує рецептори N-метил-d-аспартату, посилюючи клітинну дисфункцію та апоптоз. Показано, що антагоністи N-метил-d-аспартату покращують нейродегенерацію, опосередковану СО, у мишей [40].

## 1.2. Синтез монооксиду карбону в організмі

Окис вуглецю (СО) має багато ефектів у біології завдяки своїй складній біохімічній діяльності. Ці дії СО залежать насамперед від його здатності зв'язувати білки гему (Hr) та інгібувати або змінювати їхні біохімічні функції. Незалежно від того, як СО походить з екзогенних чи ендогенних джерел, його

клітинна активність пов'язана з концентрацією молекулярного  $O_2$ , а також з наявністю відновлених перехідних металів, таких як Fe (II). У цьому відношенні співвідношення CO /  $O_2$  та залежні від  $O_2$  зміни у місцевому стані окислення-відновлення набувають критичного значення для визначення фізіологічних ефектів CO, впливаючи на функції конкретного Нр [28].

Взаємодіючи з Нр, CO впливає на електронно - транспортні реакції різними способами, що може надати або прооксидантні, або антиоксидантні ефекти. Подібним чином співвідношення Нр також визначають, як зміни в концентрації CO впливають на фізіологічні та патологічні ефекти оксиду нітрогену та взаємозв'язок двох біологічно активних газів з металевокаталізованими окисленнями [31].

CO - продукт процесів органічного окислення, виникає *in vivo* під час клітинного метаболізму, особливо деградації гему. CO зв'язується з гемовим залізом більшості гемопротейнів. Тканинна гіпоксія після насичення гемоглобіном є основною причиною індукованої CO смертності у вищих організмів, хоча клітинні мішені не можна виключати. Незважаючи на надзвичайну токсичність при високих концентраціях, низькі концентрації CO можуть забезпечити цитопротекцію під час ішемії / реперфузії або спричиненого запаленням пошкодження тканин [36]. Подібним чином гемоксигеназа, фермент, який виробляє CO, білівердин та залізо, а також вторинне збільшення синтезу феритину в результаті окислення гему, може забезпечити захист *in vivo* та *in vitro*. Було показано, що CO впливає на кілька внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, включаючи гуанілатциклазу, яка генерує гуанозин 3':5' циклічний монофосфат та активовані мітогеном білкові кінази (МАРК). Такі шляхи частково опосередковують відомі судиннорегулюючі, протизапальні, антиапоптотичні та антипроліферативні ефекти цього газу. Екзогенний CO, що надходить у низьких концентраціях, виявляє терапевтичний потенціал як протизапальний засіб і як такий може модулювати численні патофізіологічні стани [36].

Чадний газ одержується з різних джерел у біологічних системах. Гемоксигеназа має подібну активність і є основним джерелом у ссавців і може бути однаково важливою для рослин та нижчих тварин. Фермент, як видається, є повсюдним, високо консервативним протягом усього філогенезу і жорстко регулюється під час розвитку. Це та інші дані свідчать про те, що гемоксигеназа відіграє важливу фізіологічну роль, частиною якої може бути виробництво CO [29].

Інші незначні джерела CO включають окислення органічних молекул. Сюди входить таке: аутоокиснення фенолів, флаваноїдів та галометанів; фотоокислення органічних сполук; та перекисне окислення ліпідів мембранних ліпідів. CO більше не розглядається лише як відхідний продукт, останні дослідження показують, що у центральній нервовій системі клітинна продукція CO може впливати на рівень цГМФ через вплив на активність розчинної гуанілілциклази [29].

Клітинне вироблення CO також може бути пов'язане із взаємодією клітин і може мати важливе значення у реакції клітини на зміни навколишнього середовища. Чи буде CO мати місце, подібне до оксиду азоту, у клітинному метаболізмі, досі незрозуміло, але очевидно, що ці метаболічні взаємозв'язки стануть дедалі складнішими. Активність клітинної гемоксигенази призводить до еквімолярної продукції CO та білірубіну для кожної молекули гема, що розкладається. Утворений таким чином CO дифундує в кров, передається через гемоглобін і виводиться через легені [8]. Отже, вироблення CO може бути оцінено клінічно шляхом вимірювання швидкості загальної екскреції CO в організмі, рівня COH в крові [6].

Чадний газ виникає в біологічних системах головним чином під час деградації гему як продукту окислення аметенового містка гему, процес, каталізований ферментом гемоксигеназою (HO). Індуктивна форма HO, гемоксигеназа-1 (HO-1), забезпечує захист від окисного стресу в умовах *in vitro* та *in vivo*, завдяки антиоксидантній, антиапоптотичній та протизапальній дії [23].

Хоча основні механізми в NO-залежній цитопротекції залишаються до кінця не зрозумілими, останні свідчення мають значні наслідки, що сприяє розвитку ендogenous CO внаслідок посилення активності NO. Раніше, CO розглядався як метаболічні відходи, впливаючи на функцію судин, впливаючи на регуляцію тонуусу судин, агрегацію тромбоцитів і повільну проліферація м'язів [39].

Дослідження локалізації NO - 1 у мозку залучили CO, що походить від NO, як нейромедіатор. Ці потенційні ефекти CO включають його комплексоутворення до гемової частини розчинної гуанілатциклази (*sGC*), стимулюючи вироблення гуанозину 3':5' – циклічного монофосфат (цГМФ), що є також молекулою-месенджером. Як наслідок зв'язування гему, внутрішньоклітинний CO потенційно впливає на активність інших клітинних гемопротеїнів, таких як цитохром р-450, синтаза оксиду азоту (NOS), НАДФН-оксидаза та цитохром-С-оксидаза, які беруть участь у життєво важливих процесах, включаючи детоксикацію лікарських препаратів, запалення, дихання та, можливо, зондування кисню [17].

Недавні дослідження виявили потужний протизапальний ефект CO: пригнічення вироблення прозапальних цитокінів після стимулюючих стимулів, залежно від модуляції активованого міогеном протеїнкінази (MAPK) - сигнальні каскади. Ефекти CO на MAPK, очевидно, відбуваються незалежно від активації *sGC* та *cGMP* продукції; однак пряма фізична ціль CO, в цій дії залишається невідомою [19].

CO, можуть також мати окисно-відновлювальні активні метаболіти гему, брати участь у клітинних захисних механізмах. NO здійснює антиокислювальні функції шляхом перетворення гему, чиє міжклітинне накопичення може підвищити внутрішньоклітинний прооксидантний статус у жовчні пігменти, білівердин-IX $\alpha$  та білірубін-IX $\alpha$ , які мають потужні антиоксидантні властивості [16].

Реакційне залізо, яке виділяється з гему внаслідок активності НО, може йти шляхом детоксикації, що включає або секвестрацію або позаклітинний витік.

### 1.3. Сполуки – донори монооксиду карбону

Приблизно на рубежі ХХІ століття було запропоновано, щоб СО міг переноситися до передбачуваного місця вивільнення як «проліки», а інша речовина виступала в ролі вектора. Спочатку різноманітні органічні сполуки, включаючи альдегіди, оксалати та органічні кислоти, були запропоновані як вектори для СО; однак ці речовини було відкинуті, оскільки вони мали токсичні властивості. Тоді було запропоновано використовувати неорганічні складні сполуки; у цьому випадку молекула СО зв'язується з іоном металу, при цьому зв'язок утворюється між d-орбіталями металу та sp-орбіталями СО. Ці CORM, або молекули, що вивільняють оксид вуглецю, складають нову класифіковану групу хімічних сполук, здатних виділяти контрольовану кількість СО в клітини та тканини, щоб викликати пряму біологічну активність [12].

CORM здатні виділяти СО способом, що залежить від концентрації, температури, рН та типу розчинника. Молекули CORM складаються з карбонільних груп, зв'язаних з такими металами, як рутеній (CORM-2 і CORM-3) або марганець (CORM-401), або неметалевий бор (CORM-A1) і можуть діяти як лікарський засіб [9].

Сфера CORM визначає стехіометричні та фармакокінетичні властивості вивільнення СО. Використовуючи відповідний вибір металу, ступінь окиснення та коліганди, можна націлити надходження СО до певних тканин. Сфера дії препарату повинна підпадати під конкретні умови, за яких він діятиме як донор СО. Важливим елементом потенційного CORM є його здатність вивільняти молекулу СО, пов'язану з металом, коли вона досягає пункту призначення [28].

Одним з таких механізмів є вивільнення СО шляхом обміну лігандами в тканині. Після внутрішньовенного введення CORM піддаються впливу різних



таких лігандів, і досягнення належних терапевтичних рівнів вимагає узгодження періоду напіввиведення сполуки з фармакокінетикою молекул [35]. Це можна зробити за допомогою використання полімерних гідрофобних середовищ для введення молекули донора в організм. CO також може виділятися з CORM ферментативно, з естеразами та фосфатазами. Нарешті, фізичний стимул, такий як світло, може бути використаний для відмежування CO від CORM: наприклад, вплив інфрачервоного випромінювання глибоко в організмі може бути використаний для створення нових лікарських форм [10].

CORM належать до двох груп: металеві карбонільні комплекси, що містять перехідні метали, такі як рутеній, молібден або марганець; боранокарбонати, що містять металоїд бору. Крім того, CORM можна класифікувати як розчинні у ліпідах (тобто CORM-1  $[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$  та CORM-2  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ ) або водорозчинні (тобто CORM-3  $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}$  (гліцинат)] та CORM-A1  $[\text{Na}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]]$ ). Подібні ступені вивільнення були виявлені між трьома молекулами (0,7 моль CO / моль CORM-2, 1 моль CO / моль CORM-3 та CORM-A1) [24].

Неметалічні CORMs складають ще одну невелику, але не менш важливу групу. Вони пропонують переваги простої модифікації та низької токсичності. У той час як ненасичені циклічні дикетони, ксантенові карбонові кислоти або гідроксифлавоїди залежать від опромінення, щоб виділити їх CO (*PhotoCORM*), метиленхлорид, CORM-A1 та його похідні, амінокарбоксиборани та бімолекулярний CORM не впливають: їх CO виділяється після впливу крові та інших рідин в організмі. Хоча неметалеві CORM мають менший вміст CO в молекулі, ніж металеві CORM, це не обов'язково є дефектом [7].

Вважається також, що сполуки CORM мають неактивну форму, відому як iCORM, яка утворюється з основи CORM після скидання CO. Однак деякі дослідження показують, що ці сполуки можуть також демонструвати певну форму активності. Вплив білкових реакцій, спричинених iCORM-3, таких як  $\text{NO}^-$ , в аорті щурів, хворих на діабет, і в нирковій тканині ішемізованих щурів,

припускаючи, що, незважаючи на відсутність вивільнення CO, iCORM не повністю позбавлені біологічних ефектів [31].

Численні дослідження вказують на те, що клітини реагують на активну та неактивну форми молекул CORM; тому дуже важливо дізнатись про взаємодію між CO та перехідними металами всередині молекули. Цитотоксична активність CORM, швидше за все, пов'язана з металами в них, а не з CO, який вони виділяють. Ці дослідження підкреслюють вузьку різницю між терапевтичними та токсичними дозами цих сполук, і важливо виявити механізми їх дії для запобігання накопиченню металів після вивільнення CO *in vivo* [36].

**1.3.1. Біологічні властивості донорів монооксиду карбону.** CO регулює багато фізіологічних функцій в організмі і бере участь у нормальній фізіології шлунково-кишкового тракту. Більше того, було показано, що CO проявляє антиокислювальну, протизапальну та антиапоптотичну активність і бере участь у регуляції дуоденальної секреції іонів  $\text{HCO}_3^-$  та модуляція секреції жовчі. CO, поряд із сірководнем ( $\text{H}_2\text{S}$ ) та NO, вважається фізіологічно активним газоподібним медіатором, який відіграє важливу роль у системі захисту слизової оболонки шлунку [18].

Було продемонстровано, що CO, вироблений ендogenous або виділяється з його фармакологічних донорів, включаючи диметрикарбонілдіхлорутенію (II) (CORM - 2), захищає слизову шлунку від пошкоджень, спричинених системним стресом або введенням етанолу, алендронату або аспірину (ASA). Також, насичений CO сольовий розчин сприяє загоєнню виразки шлунку, але механізм цього сприятливого впливу на загоєння виразки вивчений мало [20].

CO, що виробляється ендogenous шляхом деградації гему або CO, що виділяється з донора хімічної речовини, CORM-2, може забезпечити захист від стресових уражень слизової. Механізм CO шлунково-кишкового тракту може включати регуляцію мікроциркуляції шлунку внаслідок активації системи sGC / GMP, а також антигіпоксичну та протизапальну дію цієї газоподібної молекули.

Більше того, було продемонстровано, що гастропротекція CO проти стресових уражень шлунку може бути опосередкована ендогенними PGs, цитопротективними продуктами метаболізму арахідонату, регульованими активністю металопротеїдів, COX-1 та COX-2 та взаємним збільшенням експресії захисного ферменту NO<sup>1</sup> спостерігається в слизовій оболонці шлунку, порушеному стресом [21].

Крім того, індукований CO гастрозахист від пошкодження стресом, здається, не залежить від NO, який є ще одним важливим газовим посередником. Однак механізм взаємодії CO, NO та іншої сильнодіючої газоподібної молекули, H<sub>2</sub>S, у захисті слизової оболонки шлунку від стресу вимагає підтвердження в подальших дослідженнях.

Гострий панкреатит - це запальне захворювання, що супроводжується пошкодженням ацинарних клітин, і швидка секреція та вивільнення запальних факторів призводить до місцевого запалення підшлункової залози та системних ускладнень. Загальновідомо, що цитокіни та окислювальний стрес беруть участь у патофізіології гострого панкреатиту. Незважаючи на значну захворюваність та смертність, пов'язані з гострим панкреатитом, ефективних терапевтичних заходів досі не було [16].

Екзогенний CO має особливу та незалежну роль у модуляції запалення. Було продемонстровано, що CORM-2 інгібує вироблення та вивільнення цитокінів при сепсисі, викликаному ліпополісахаридом (LPS) та пункцією сліпої кишки. Крім того, *Xue* та *Habtezion* повідомили: «CORM-2 знижує рівень системних запальних цитокінів та пригнічує системну та підшлункову секрецію макрофагів TNF- $\alpha$  на мишачій моделі гострого панкреатиту. Однак потенційні механізми CO в гострому панкреатиті не були повністю зрозумілими» [17].

Для вивчення терапевтичної функції CO була встановлена модель миші з гострим панкреатитом з використанням церулеїну. У дослідженні було продемонстровано, що церулеїн викликав значну смертність, високо підвищений рівень амілази та ліпази в сироватці крові та помітно підвищував апоптоз підшлункової залози через 12 годин після індукції гострого

панкреатиту. Лікування CORM-2 знижувало смертність, знижувало рівень амілази та ліпази в сироватці крові та гальмувало апоптоз підшлункової залози [11].

Обробка мишей іCORM-2 з гострим панкреатитом не справила помітного впливу на пошкодження підшлункової залози, порівняно з мишами які мали гострий панкреатит. Крім того, легкі гістологічні зміни в підшлунковій залозі спостерігались у групі лікування CORM-2 порівняно з групою гострого панкреатиту, тоді як лікування іCORM-2 не полегшило пошкодження підшлункової залози [31].

Також було продемонстровано, що CORM-2 ефективно попереджає хемотаксис нейтрофілів та інфільтрацію в підшлунковій залозі після гострого панкреатиту та пригнічує окислювальний стрес, а отже, зменшує травмування підшлункової залози. Крім того, окислювальний стрес є однією з основних причин пошкодження ДНК і смерті ацинарних клітин. Апоптоз був досліджений у мишей з гострим панкреатитом, і рівень апоптозу в підшлунковій залозі суттєво знизився після лікування CORM-2 [15].

Під впливом карбонільного комплексу металу, трикарбоніл хлор (гліцинат) рутенію (II) (CORM-3) виявлено релаксанти властивості судин. Трикарбоніл хлор (гліцинат) рутенію (II) здійснює вплив на судини (в більших випадках на артерії) резистентності нирок; впливає на кількісну продукцію в ендотелії речовин, які взаємозв'язані з монооксидом вуглецю або полегшують СО активацію. Ендотеліальні фактори (наприклад, такі як NO) здатні зв'язуватися з металами, а саме з рутенієм і зменшувати зв'язок між карбоксидними групами і молекулами трикарбоніл хлор (гліцинат) рутенію (II) з його перехідним металом, який і буде вивільняти монооксид вуглецю [12].

Рутенієві комплекси легко зв'язуються з молекулами оксиду нітрогену і можуть скидати молекули оксиду нітрогену в біологічних системах. Крім того, CORM-3 з його донорами часто використовують в хімії в якості вихідних матеріалів для отримання нітрозильних комплексів цих речовин, користуючись тим, що метал має високу спорідненість до оксиду азоту у порівнянні з СО [2].

## 1.4. Гемокоагуляція – як одна із основних ланок гемостазу

**1.4.1. Основний механізм коагуляції.** Щоб зрозуміти еволюцію гемостазу, корисно вивчити примітивну систему згортання хребетних. Підковові краби (*Limulus*) жили на Землі понад 350 мільйонів років; таким чином, їх часто називають живими скам'янілостями. У крові (гемолімфі) *Limulus* кисень транспортується мідь-вмісним білком гемоціаніном. Єдиними циркулюючими клітинами крові є амебоцити (гемоцити), які містять бактерицидні та коагуляційні білки зимогену, які виділяються при активації. Ключовими компонентами коагуляції в *Limulus* є серинові протеази, білки згортання крові (коагулоген, фактор С) і трансглютаміназа (фермент, подібний фактору XIII). Коли амебоцити піддаються дії ендотоксину (у морській воді) після пошкодження, серинові протеази перетворюють коагуген у коагулін, який полімеризується трансглютаміназою. Ця основна система коагуляції дозволяє *Limulus* локально ізолювати пошкодження та вторгнення патогенів [4].

Коагуляція *Limulus* має кілька прямих наслідків для людини. По-перше, тест *Limulus* (лізат амебоцитів) використовується клінічно та комерційно для виявлення бактеріального забруднення крові, різних матеріалів (наприклад, мікросхем) та навколишнього середовища. Цей тест заснований на згортанні гемолімфи, яка зазнає впливу ендотоксину, який може бути присутнім у плазмі людини або в навколишньому середовищі. По-друге, кінцевий етап згортання у людини є досить подібним до етапу в *Limulus*, коли тромбін (серинова протеаза) перетворює фібриноген у мономер фібрину, який полімеризується активованим тромбіном фактором XIII (трансглютаміназа) [14].

**1.4.2. Ініціація коагуляції.** Подібно до того, як амебоцити виявляють порушення в броні підковоподібного краба, у людей циркулююча кров швидко реагує на порушення ендотелію судин, щоб обмежити кровотечу [11]. Початкова гемостатична відповідь викликається тканинним фактором (TF;

тромбопластин), що виражається на субендотеліальних перицитах та фібробластах. Активованій фактор VII (fVIIa), сери нова протеаза, яка зазвичай циркулює в крові в низькій концентрації, зв'язується з TF, щоб активувати фактор X до fXa. Згодом fXa (також серинова протеаза) утворює незначні кількості (0,1–1 нМ) тромбіну. Є два інгібітори, які регулюють реакції прокоагулянтів, спричинені TF, обмежуючи тим самим дії сери нової протеази до місця пошкодження судин. Інгібітор тканинного фактора (TFPI) нейтралізує fXa, коли він знаходиться в комплексі з TF-fVIIa [7].

Іншим регулятором реакції прокоагулянта TF-тригера є антитромбін (АТ, раніше званий антитромбіном III; інгібітор серигової протеази; SERPIN), який циркулює у високій концентрації (150 мкг / мл) та нейтралізує спочатку утворені fXa та тромбін. Таким чином, реакція спрацьовування прокоагулянта протікає лише тоді, коли TF піддається впливу на досить високому рівні, щоб подолати інгібування TFPI та АТ. Іншими словами, fVIIa патрулює циркуляцію в пошуках місць ураження судин (тобто там, де піддається ТФ), а слідові кількості fXa та тромбіну подають сигнал тривоги щодо будь-якої потенційної небезпеки. Ця діяльність ретельно контролюється природними інгібіторами, які запобігають «помилковій тривозі» або «занадто великій реакції» [25].

**1.4.3. Локалізація процесів коагуляції.** Циркулюючі тромбоцити сприяють локалізованому утворенню тромбу в місці пошкодження судин спочатку завдяки приєднанню до субендотеліального колагену-фактора фон Віллебранда (vWF) через їх глікопротеїнові (GP) Іb-рецептори. Тромбін, генерований TF-fVIIa / fXa («зовнішній шлях»), здатний активувати прилеплені тромбоцити поблизу через активовані протеазами рецептори 1 та 4 (PAR1 та PAR4). Тромбоцити, що активуються, відіграють ключову роль у подальшій коагуляції [39].

Процеси ідуть декількома шляхами. По-перше, тромбоцитарні рецептори GPIb зв'язуються з фактором XI, а також вони локалізують фактор VIII до місця порушення ендотелію через його білок-носій vWF. Крім того,

частково активований фактор V виділяється з  $\alpha$ -гранул тромбоцитів при активації тромбоцитів. Фактори XI, VIII і V беруть участь у підтримці прокоагулянтних реакцій («внутрішній шлях») після активації, опосередкованої тромбіном. Сериновий протеазний фактор XIa опосередковує активацію фактора IX до fIXa, а fVIIIa служить кофактором до fIXa. Фактор IXa, серинова протеаза, активує фактор X до fXa, а fVa служить кофактором до fXa. За відсутності fVIIIa або fIXa, як це клінічно спостерігається при гемофілії A або B, відповідно, ініціювання коагуляції є нормальним явищем, але ступінь розповсюдження суттєво зменшується [38].

У пацієнтів з гемофілією розвиваються періодичні кровотечі в м'язах і суглобах через низьку експресію TF (таким чином, ініціювання коагуляції швидко гасяться TFPI та AT). Застосовуючи високі дози рекомбінантного fVIIIa (90–120 мкг / кг), рецидивуючу кровотечу можна зменшити за рахунок збільшення продукції fXa для подолання TFPI та AT (таким чином покращене утворення тромбіну) у хворих на гемофілію з інгібуючими антитілами проти фактора VIII або фактора IX [22].

Три ключові компоненти (субстрат, фермент, прискорювач [кофактор]), зосереджені на активованій поверхні тромбоцитів, необхідні для місцевого утворення тромбіну. Один тромбоцит, що активується тромбіном, виявляє більше 12000 копій рецепторів GPIIb / IIIa, які можуть концентрувати фібриноген для ефективного утворення фібрину. Крім того, похідний із плазми та тромбоцитів фактор XIII активується тромбіном до fXIIIa, трансглютамінази, яка швидко зшиває [14].

Таким чином, локалізований фібриноген та фактор XIII є кінцевими субстратами тромбіну, які відіграють ключову роль у стабілізації первинної гемостатичної пробки. При важкому дефіциті фібриногену тромбоцити локалізуються внаслідок взаємодії vWF-GPIIb, але не можуть набирати молекули фібриногену до рецепторів GPIIb / IIIa. Відсутність утворення фібрину на поверхні тромбоцитів призводить до витіснення тромбоцитарних

пробок. Клінічно така ситуація спостерігається як періодичні кровотечі та парадоксальний тромбоз при вродженій афібриногенемії [25].

*Коагуляція in vitro.* Протромбіновий час (PT) та активований частковий тромбопластиновий час (aPTT) на сьогоднішній день є найпоширенішими скринінговими тестами на порушення коагуляції. Ці тести відповідають, відповідно, зовнішнім і внутрішнім шляхам моделі каскаду [39].

Спочатку PT був розроблений як експрес-тест для вимірювання рівня протромбіну шляхом додавання великої кількості TF (екстракту мозку кролика) до плазми. У аналізі PT, кількість TF, що використовується для ініціювання згортання *in vitro*, значно перевищує порівняно з умовами *in vivo*, що призводить до швидкого утворення тромбіну та активації фактора V за допомогою зворотного зв'язку. Однак очевидно, що механізм коагуляції *in vivo* не повністю відображається ПТ, оскільки повторна кровотеча виникає при гемофілії (дефіцит фактора VIII або фактора IX), незважаючи на нормальні значення ПТ [14].

Концентрація TF, мабуть, набагато нижча *in vivo*, і, отже, PT був модифікований для оцінки гемофільної плазми з використанням «часткового тромбопластину» (тобто фосфоліпиду з мінімальним TF, виділеного з неочищеного тромбопластину ультрацентрифугуванням та розведенням). У PTT (частковий тромбопластин час), опосередкована fVIIa продукція fXa та тромбіну обмежена за умови низького рівня TF, і, як результат, діяльність fXa та fVIIa як альтернативного джерела fXa стає критичною для згортання. ПТТ було вдосконалено для відтворюваності шляхом додавання контактного активатора (наприклад, каоліну, ціоліту або еллагової кислоти) в аналіз, відомий як активований PTT (aPTT) [37].

У присутності активатора контактної системи, серія серинові протеази активації відбуваються в порядку спадання фактора XIIa  $\rightarrow$  XIa  $\rightarrow$  IXa  $\rightarrow$  Xa, в результаті чого утворюється тромбін. Хоча активація фактора XII контактним активатором не вважається важливою для нормального гемостазу (оскільки пацієнти з дефіцитом фактора XII не кровоточать), aPTT чутливий до грубого



зниження факторів XII, XI, IX, VIII, V і меншою мірою, протромбіну. Послідовність активацій сери нової протеази протікає дуже повільно в аРТТ, оскільки кофактори, fVIIIa та fVa, недоступні, поки тромбін не генерується для їх активації [4]. Таким чином, аРТТ застосовується клінічно для моніторингу антифункціонованого антикоагулянта гепарину, аргатробану, бівалірудину та лепірудину (примітка: для кожного антикоагулянта потрібно спеціальне калібрування), оскільки всі ці інгібітори тромбіну зменшують активовану тромбіном зворотну активацію факторів VIII та V (Таблиця 1.1) [37].

Таблиця 1.1

**Рівень фактора коагуляції, необхідний для нормального РТ, аРТТ та гемостазу *In vivo***

<b>Фактор</b>	<b>РТ</b>	<b>аРТТ</b>	<b><i>In vivo</i><sup>a</sup></b>
Фібриноген (мг/dL)	100	60	50 – 100
Протромбін (%)	50	15	20 – 30
Фактор V (%)	50	40	20
Фактор VII (%)	50	Не впливає	10
Фактор X (%)	60	25%	20
Фактор VIII (%)	Не впливає	35%	40
Фактор IX (%)	Не впливає	20%	30
Фактор XI (%)	Не впливає	30%	50
Фактор XII (%)	Не впливає	20%	0
Фактор XIII (%)	Не впливає	Не впливає	5
vWF (%)	Не впливає	Не впливає	30

Примітка: vWF - субендотеліальний колаген-фактора фон Віллебранда. РТ – протромбіновий час. аРТТ – активований протромбіновий час.

Гемостатичний час на основі дефіциту одного фактора неможливо визначити час для хірургічних пацієнтів з мультифакторною недостатністю;

наприклад, гемодилуцією. Важкий дефіцит фактору vWF може вплинути на аРТТ, оскільки період напіввиведення фактора VIII зменшується [39].

Хоча РТ / аРТТ можна використовувати для керування антикоагуляцією, слід зазначити кілька важливих обмежень, коли вони вимірюються для оцінки кровотечі. Періоперативно кровотеча спричиняється множинними дефектами згортання через гемодилуцію, втрату споживання, фібриноліз, використання антикоагулянтів, переохолодження та інші механічні та метаболічні розлади. фактори згортання [25]. Активовані тромбоцити здатні локально накопичувати фактори згортання, і, отже, ступінь кровотечі при тривалому РТ / аРТТ може змінюватися залежно від кількості тромбоцитів та / або їх функції. Крім того, неможливо оцінити загальну стабільність гемостатичного тромбу за допомогою РТ / аРТТ, оскільки обидва тести припиняються до того, як фібрин полімеризується fXIIIa. Дефіцит вродженого фактора XIII пов'язаний з пуповинною кровотечею та внутрішньочерепними крововиливами, але цей дефіцит не виявляється при скринінгу РТ / аРТТ, при вродженому дефіциті  $\alpha$ 2-антиплазміну. На відміну від РТ / аРТТ, використання тромбеластографії / метрії дозволяє з'ясувати функціональну активність фібриногену, фактора XIII та фібринолітичних білків [40].

*Ендотеліальне регулювання коагуляції.* Інтактний ендотелій має безліч антикоагулянтних функцій, які підтримують кров у рідкому стані (Таблиця 2). Ендотелій послаблює активність тромбоцитів, виділяючи оксид азоту, простациклін та екто-АДФазу (остання розкладає аденозиндифосфат). Існує кілька інгібіторів згортання, які виробляються ендотеліальними клітинами. Похідний з ендотелію TFPI локалізується на його поверхні і швидко випускається в кровообіг після введення гепарину, зменшуючи прокоагулянтну активність TF-fVIIIa. Ендотеліальні клітини також виділяють сульфат гепарану, глікозаміноглікан, який каталізує антикоагулянтну активність АТ. Плазма АТ зв'язується з сульфатом гепарану, розташованим на поверхні просвіту та в базальній мембрані ендотелію [22].

Тромбомодулін - ще один зв'язаний з ендотелієм білок з антикоагулянтною та протизапальною функцією. У відповідь на системні прокоагулянтні подразники активатор плазміногену тканинного типу (tPA) тимчасово вивільняється з тіл Вейбеля-Палада ендотеліальних клітин для сприяння фібринолізу. (PAI) -1 та PARs (Таблиця 1.2) [37].

Велика площа поверхні ендотелію вимагає постійного відновлення, а отже, тромбоцити та фактори згортання споживаються з базальною швидкістю за відсутності клінічно очевидних пошкоджень судин. Базальне (гомеостатичне) утворення тромбіну демонструється циркулюючими комплексами тромбіну-АТ та іншими маркерами згортання крові (наприклад, протромбіновий фрагмент) навіть за відсутності явної кровотечі [11].

Подібним чином, базальне споживання тромбоцитів становить приблизно  $7 \times 10^3$  мм<sup>-3</sup> на добу (нормальна кількість  $150\text{--}350 \times 10^3$  мм<sup>-3</sup>), рівень тромбоцитів, що відповідає порогу ( $\leq 10 \times 10^3$  мм<sup>-3</sup>) для спонтанної кровотечі [11].

Таблиця 1.2

**Модулятори коагуляції, диференціально виражені  
в ендотеліальних клітинах**

<b>Фактор</b>	<b>Судинний розподіл</b>	<b>Значення</b>
ADAMS - 13	V/A	35
Ендотеліальна синтаза оксиду азоту	A	
Рецептор ендотеліального білка C	V/A	
Гепаран сульфат	Змінний фактор EC	36
Інгібітор активатора плазміногену-1	A	
Простациклін	A/V	37
Тканинний фактор	Непомічений у спокою EC	

Інгібітор шляху тканинного фактора	С	38
Активатор плазміногену тканинного типу	А	
Тромбомодулін	А/В/С Окрім головного мозку	39
Vwf	В/А	40

Примітка: А – артерія. В – вена. С – капіляри. ЕС – ендотеліальні клітини.

Гемостатична реакція, як правило, обмежується місцем ураження судин, оскільки ключові серинові протеази пов'язані з мембраною на активованих поверхнях тромбоцитів. Порівняно мало молекул fXa та тромбіну виводяться з місцевого середовища. Нижче до судинної травми комплекс TF-fVIIa / fXa інгібується TFPI. Плазмовий (вільний) fXa та тромбін швидко нейтралізуються гепаран-пов'язаним АТ. Тромбін також поглинається ендотеліальним поверхнево-зв'язаним тромбомодуліном [38].

Зв'язування тромбомодуліну з екзозитом І тромбіну оптимізує каталітичну активність тромбіну щодо утворення природного антикоагулянтного білка С та TAFI (інгібітор тромбінового активатора фібринолізу). Було показано, що системна циркуляція активованого білка С (APC) виконує безліч протизапальних та цитопротекторних функцій, модулюючи ендотеліальний рецептор білка С та активований протеазами рецептор-1 (PAR-1, рецептор тромбіну) за допомогою механізмів, що все ще досліджуються. TAFI також надає протизапальну дію, розщеплюючи брадикінін і C5a [6].

Безперервне вивільнення fXa, тромбіну та розчинного фібрину в системний кровообіг призводить до активації фібринолітичної системи (вивільнення tPA), яка розчиняє нерозчинний фібрин і запобігає ішемії, викликаній відкладенням тромбу в кінцевих органах. Великі мультимери vWF також збільшуються під час запалення, і вони регулюються зниженням

дезинтегрином та металопротеазою з мотивом тромбоспондину 1 типу, член 13 (ADAMTS-13), який також синтезується ендотеліальними клітинами [7].

У пацієнтів з хронічним рецидивуючим тромбоцитопенічною пурпура, сильно знижена активність ADAMTS-13 (<5%) може збільшити циркулюючі надвеликі мультимери vWF, які сприяють внутрішньосудинній агрегації тромбоцитів і тромбозу [22].

*Періоперативні зміни в коагуляції.* Травматичні та хірургічні пацієнти мають різний ступінь ураження судин та знекровлення. Масивні крововиливи призводять до поступового розведення факторів згортання до 30% від норми після втрати 1 об'єму крові та до 15% після втрати 2 об'ємів крові. За наявності важкої гемодилуції ініціювання генерації тромбіну затримується зниженим фактором VII, а розповсюдження зменшується за рахунок валового скорочення про коагулянтів сери нової протеази зимогенів та прискорювачів [25].

Ефективність утворення тромбіну додатково знижується за рахунок зменшення кількості тромбоцитів, яка зменшується до  $50 \times 10^3$  мм<sup>-3</sup> через втрату 2 об'ємів крові. PT і aPTT також вказують на «стан гіпокоагуляції», оскільки вони наближаються більш ніж в 1,5 рази від норми. Два важливих субстрати тромбіну, фібриноген та фактор XIII також швидко знижуються під час гемодилуції; фібриноген знижується до 100 мг / дл після втрати 14% об'єму крові. Знижена генерація тромбіну, низький вміст фібриногену та низька активність фактора XIIIа роблять згусток фібрину сприйнятливим до тПА-індукованого фібринолізу. Нестабільне утворення згустку фібрину через низький вміст фібриногену та / або фактора XIII призводить до рясної кровотечі, але також може становити проблему локалізації прокоагулянтної активності. Полімеризований фібрин, здається, відіграє роль в утриманні надлишку молекул тромбіну та fXa всередині тромбу. Насправді AT I, який спочатку описували як антикоагулянтний білок, виявився фібрином [37].

При сильній гемодилуції антикоагулянтні білки, включаючи TFPI, AT , білок C, білок S та зв'язаний з ендотелієм тромбомодулін поступово знижуються. Таким чином, прокоагулянт та прозапальна активність тромбіну

може не швидко придушуватися після вивільнення тромбіну (зі слабких згустків у місці пошкодження) в обіг. Дефіцит або фібриногену, або фактора XIII, схоже, пов'язаний з підвищенням плазмових маркерів утворення тромбіну.

Сучасна гемостатична терапія післяопераційних кровотеч складається з аlogenної свіжозамороженої плазми, кріопреципітату та концентратів тромбоцитів. Нещодавно концентрати факторів, отриманих із плазми, такі як фібриноген, фактор XIII та рекомбінантно активований fVIIa, все частіше застосовуються у післяопераційних хворих емпіричним способом [22].

Ці компоненти можуть дозволити швидке відновлення певних елементів коагуляції без необхідності перехресного збігу, уникаючи при цьому внутрішньосудинного перевантаження. Крім того, знижується ризик передачі інфекції, оскільки вони стерилізуються щодо відомих на сьогодні вірусів. Однак необхідні додаткові дослідження, щоб довести свою безпеку в періопераційному режимі, оскільки хірургічні пацієнти демонструють множинні дефіцити білків прокоагулянтів та антикоагулянтів. Наприклад, важкі періопераційні кровотечі після масивної трансфузії часто покращуються використанням рекомбінантного fVIIa (20– 90 мкг / кг); однак є кілька зареєстрованих випадків системного тромбозу [7].

Знижені фактори згортання крові та інгібітори відновлюються після операції протягом декількох днів. Гострі запальні реакції, пов'язані з пошкодженням судин і загоєнням ран, часто призводять до підвищення рівня цитокінів, кількості тромбоцитів, фібриногену, vWf-фактора VIII та PAI-1 понад норму. Синтез TFPI та AT не збільшується, експресія ендотеліального тромбомодуліну зменшується за рахунок запальних цитокінів (наприклад, фактор некрозу пухлини, інтерлейкін-1 $\beta$ ). Дисбаланс елементів прокоагулянтів та антикоагулянтів може збільшити ризик протромботичних ускладнень у післяопераційному періоді. Профілактичне застосування антитромботичної терапії слід розглядати на основі типу операції, гематологічного анамнезу та інших характеристик пацієнта (наприклад, віку, ожиріння) [22].

*Контроль гіперкоагулювання.* Порушений баланс між прокоагулянтами та антикоагулянтами системи згортання може призвести до протромботичних подій та пов'язаних захворюваності й смертності. Тромбози можуть бути викликані надлишковою функцією факторів прокоагуляції або неможливістю антикоагулянтних білків придушити реакцію згортання. Ці стани можуть виникати внаслідок фізіологічних змін (наприклад, старіння), спадкових причин, стану набутого захворювання (наприклад, атероматозна хвороба, рак, антифосфоліпідний синдром), лікарських препаратів (наприклад, оральної контрацепції) та інших додаткових причин (Таблиця 1.3) [11].

Частота венозних та артеріальних тромбозів зростає в геометричній прогресії з віком, і це частково можна пояснити розвиненою атероматозною хворобою, раком, різними хірургічними втручаннями та нерухомістю. Тромботичні оклюзії коронарних та мозкових артерій пов'язані з активацією тромбоцитів і коагуляція, спричинена розривом атеросклеротичного нальоту, що призводить до інфаркту міокарда та ішемічного інсульту [38].

Таблиця 1.3

### Ризики тромбозу вен та артерій

Венозні тромби	Артеріальні тромби
Вік	Вік
Велике хірургічне втручання або травма	Миготлива аритмія
Абдомінальна хірургія	Гіперхолестеринемія
Заміна стегна / коліна	Гіпертонія
Рак	Діабет
Антифосфоліпідний синдром	Куріння
Індукована гепарином тромбоцитопенія	Тромботична /тромбоцитопенічна пурпура
Ліки (наприклад, леналідомід)	Індукована гепарином тромбоцитопенія (рідше)
Нерухомість (наприклад,	Ліки (наприклад, інгібітор COX-2)

авіаперевезення)	
Ожиріння	Пристрої (наприклад, механічний клапан, стент, що елює ліки)
Вагітність	Спадковий фактор
Використання контрацептивів або заміщення гормонів	Гіпергомоцестінемія MTHFR 677C-T варіант
Медичні інструменти і (наприклад, центральний венозний катетер)	Поліморфізм b-ланцюга фібриногену (суперечливий)
Спадковий фактор	Поліморфізм PAI-1 (несумісний)
Фактор V Лейден	Поліморфізм TAFI (несумісний)
Протромбін G202110A	
Дефіцит антитромбіну	
Дефіцит білка C	
Дефіцит білка S	

Примітка: COX – циклооксигеназа. MTHFR –метилентетрагідрофолат. PAI-1 - інгібітор активатора плазміногену. TAFI - інгібітор фібринолізу, що активується тромбіном.

У хворих на рак, медіатори росту пухлини, включаючи TFN та інші цитокіни (наприклад, інтерлейкін-1 $\beta$ ), можуть викликати коагуляцію та знижувати регуляцію антикоагулянтної системи, збільшуючи частоту венозних тромбоемболій. Ряд хіміотерапевтичних препаратів також пов'язаний із збільшенням тромбозів (l-аспарагіназа, леналідомід, тамоксифен та ін.) хірургічне втручання та нерухомість збільшують ризик тромбозу вен [11].

Вроджені дефіцити AT, білка C і білка S призводять до зниження здатності регулювати вироблення тромбіну і, таким чином, схильні до уражених людей до глибокого венозного тромбозу та легеневої емболії. Поліморфізм одного нуклеотиду в гені Фактора V (зазвичай Arg506  $\rightarrow$  Gln ; *Factor V Leiden*) - ще один приклад дисфункціональної регуляції тромбіну, оскільки опосередкована APC інактивація фактора *VLeiden* відбувається повільніше, ніж зазвичай. Мутація Лейдена V поширена у північних європейців (гетерозиготний 5% –10%), збільшуючи ризик тромбозу вен у гетерозигот у 3–8



разів, а в гомозигот - до 80 разів. Поліморфізм протромбіну (варіант G20210A) пов'язаний з високим рівнем протромбіну в плазмі (> 115% від норми) та підвищеним ризиком тромбозу глибоких вен та легеневої емболії [8].

Антифосфоліпідний синдром є прикладом набутого тромбофільного стану, пов'язаного із збільшенням ризику венозної емболії та втрати вагітності. Характеризується наявністю фосфоліпідів, що зв'язують антитіла (так званий вовчаковий антикоагулянт). Незважаючи на тривалий ПТ та АРТТ, антитіла до вовчака не виявляють антикоагуляції. Навпаки, передбачається, що комплекс, який утворюється між аутоантитілами та  $\beta 2$ -GP I (аполіпропротеїн H), перешкоджає ендогенній антикоагуляції (наприклад, TFPI, APC) і посилює систему згортання та запалення [27]. Хоча частота розвитку тромбоемболії низька (3–30 на 10000 на рік), використання оральних контрацептивів (комбінація естрогену та гестагену) може потенційно викликати зміщення стану прокоагулянтів. Це пов'язано з індукованим естрогеном збільшенням факторів VII, IX, X та XIII та зменшенням АТ та білка S [4].

Після того, як клінічний діагноз тромбофілії виявляється як артеріальний та венозний тромбоз, профілактична та терапевтична антитромботична терапія, як правило, необхідна для запобігання повторному виникненню тромбозів і зменшення захворюваності та смертності від оклюзії судин у основних органах. З початку 20 століття похідні кумарину та нефракціонований гепарин (далі - гепарин) використовуються для профілактики та лікування різних тромботичних станів. За останні кілька років з'явилися нові препарати з більш передбачуваною фармакокінетикою, ніж ці препарати, що вводили гепарин з низькою молекулярною масою (НМГ) та синтетичний пентасакхарид. В артеріальному кровообігу активація тромбоцитів є тригерною подією для тромбозу - процесу, який неможливо адекватно придушити гепарином та кумаринами. Таким чином, антиагрегантна терапія є основною стратегією для профілактики або лікування артеріального тромбозу [5].

Основними препаратами для цієї мети є аспірин та клопідогрель. Інші парентеральні антиагрегантні препарати, включаючи інгібітори GP IIb / IIIa, можуть вводитися під час шкірних утручань коронарних артерій. В даний час нові оральні та внутрішньовенні антитромбоцитарні препарати досліджуються.

**1.4.4. Коагулограма як показник стану організму.** Кров вважалася священною з давніх часів. Китайський ієрогліф крові походить від ієрогліфічного символу «жертви, поміщеної в посудину». Здатність перетворювати компоненти крові з рідкої у тверду форму являє собою мережу ферментативної активації та гальмування. Сучасна концепція коагуляції була представлена в 1964 році. Як модель водоспаду / каскаду, яка може вразити багатьох не гематологів своєю складністю згортання крові. З часом, згортання крові перетворилося на надзвичайно досконалий захисний механізм для виявлення травм на тілі та запобігання знекровлення для покращення виживання. Системи згортання крові необхідні з огляду на багаторазове порушення цілісності судин, яке відбувається протягом усього життя [1].

Крововиливи в умовах важкої травми є основною причиною смерті у всьому світі. Патофізіологія крововиливу та коагулопатії при важкій травмі є складною і залишається недостатньо вивченою. Більшість клініцистів, які в даний час лікують пацієнтів з травмою, визнають наявність коагулопатії, властивої лише пацієнтам з травмою - коагулопатія, спричинена травмою (ТІК), яка незалежно пов'язана зі збільшенням смертності. Складність і неповне розуміння ТІК призвело до значних суперечок щодо оптимального управління. Хоча більшість травматологічних центрів використовують масивні протоколи переливання крові з фіксованим співвідношенням при важких травматичних крововиливах, загально визнане «ідеальне» співвідношення крові до продуктів крові залишається невловимим [11]. Нещодавнє використання в'язко пружних гемостатичних аналізів (VHA) для керівництва заміною препаратів крові ще більше викликало суперечки щодо оптимальної стратегії переливання крові.

Згортання крові - природний процес, який може бути як корисним, так і небезпечним для людського організму. Він дозволяє підтримувати гемостаз після пошкодження судин, але також може спричинити тромбоз глибоких вен та серцевий інсульт. Невідповідна коагуляція крові є основною причиною захворюваності та смертності у всьому світі, складаючи приблизно 40% усіх смертей [39].

Більшість існуючих клінічних тестів гемостазу, таких як протромбіновий час, частковий тромбопластин та активовані тести часу згортання крові, проводяться на плазмі, що містить усі фактори згортання. Вони є аналізами, призначеними для виявлення специфічних дефектів утворення згустків, але не можуть визначити гіперкоагуляцію. Ці аналізи обмежені мінливістю реагентів, методологій та штучних умов аналізу, які не точно відтворюють фізіологічну подію. Крім того, вони не надають жодної інформації про якість згустку або динаміку його утворення. Протягом останніх десятиліть багато дисциплін прикладних досліджень намагалися зрозуміти складне явище процесу згортання крові, а саме механічне, оптичні та ультразвукові методи характеристики для тестів *in vitro* [37].

Методи виявлення в'язкості та еластичності дають змінні результати залежно від форми згустків фібрину, тобто кількості або в'язкості фібрину і сили магнітного поля елемента. Крім того, неможливо виявляти коагуляцію, якщо в'язкість не збільшується вище певного рівня. Метод виявлення каламутності передбачає змішування зразка плазми та реагенту коагуляції, а потім вимірювання змін у пропущеному світлі або розсіяному світлі під час процесу коагуляції плазми [4].

Невеликі зміни в пропущеному або розсіяному світлі можна виявити навіть при низькому рівні фібрину, і, отже, він позбавлений недоліків методу виявлення в'язкості. Тим не менше, мало зразків *in vitro*, які також використовуються в клінічній практиці, проводяться на зразках крові. Недавні дослідження виявили важливу необхідність у розробці точних та глобальних стандартних тестів на згортання крові *in vitro* з використанням зразків крові. Ці

нові тести повинні доповнювати існуючі стандартні тести, що проводяться зі зразками плазми [39].

Через природу акустичних хвиль методи ультразвукового вимірювання мають основні переваги, дозволяючи використовувати зразки крові. Вимірювання ультразвукового зворотного розсіювання, швидкості звуку та ослаблення ультразвуку використовувались для аналізу процесу згортання крові та утворення згустків. В оптиці згортання крові вивчали в спеціальній склянці шляхом аналізу властивостей відбитої хвилі. Зразки крові підсвічували гранієвим ітрієвим алюмінієвим гранатовим лазером, а коагуляцію характеризували за показником заломлення та коефіцієнтом поглинання [38].

Більше десятиліття розробляється ще одне зростаюче поле досліджень, яке дозволяє оцінити мікроструктури м'яких біологічних тканин, а саме оптична когерентна томографія (ОКТ), яка спирається на коротку інтерферометрію часової когерентності та вимірює оптичний шлях й інтенсивність спіну - віддзеркалене ближнє інфрачервоне світло [7].

Нещодавно властивості крові широко вивчали за допомогою ОСТ та доплерівського ОСТ (ODT) завдяки їх високій роздільній здатності, режиму реального часу та неінвазивним можливостям. ОСТ сигнал зворотного розсіювання та ODT дисперсійна візуалізація широко застосовується для характеристики деяких властивостей крові, таких як гематокрит (HCT), агрегація еритроцитів (клітин еритроцитів), оптичне очищення крові та фотокоагуляція крові в нашій та інших групах [39].

Оскільки методика ОКТ вимірює глибинний розподіл інтенсивності з високою роздільною здатністю, зміни глибинного розподілу коефіцієнта розсіювання крові або показника заломлення відображаються на змінах сигналу ОКТ. Таким чином, оскільки згортання крові може ввести локальні зміни в їх оптичних властивостях (коефіцієнт розсіювання та місцеві й середні показники заломлення), можна відстежувати та кількісно визначати процес коагуляції, аналізуючи нахил сигналу ОСТ (OCTSS), який відображає найменше розсіювання крові до певної міри та  $1 / e$  глибина проникнення світла ( $d \ 1 / e$ ),

що точніше представляє багаторазове розсіювання крові. Для кращої оцінки властивостей крові під час коагуляції спробували застосувати нахил сигналу ОСТ та глибину проникнення світла  $1 / e$  для відстеження процесу згортання крові й утворення згустків у зразках крові різних гематокритів у діапазоні від 25% до 55%. Вимірювання проводиться з використанням  $13^{10}$  нм ОСТ.

Згортання крові відіграє важливу роль у стримуванні крововтрати та у відновленні судинної травми (рани). Зі збільшенням тривалості життя, судинні травми виникають внаслідок різних процесів захворювання (наприклад, атеросклероз, діабет), що може призвести до ненавмисної активації прокоагулянтів та прозапальних реакцій, що призводить до тромботичної закупорки судин. Для попередження судинних ускладнень у вразливих пацієнтів за допомогою хімічного синтезу та біомедичної техніки. Дедалі кращий контроль над тромбозом досягнуто цілеспрямованим пригніченням активності сери нової протеази або активацією тромбоцитів [27].

Однак періопераційне лікування гемостатиком ускладнюється через необхідність зменшення крововиливу без тромботичних ускладнень. Проте, наше розуміння системи згортання крові розвинулося за останнє століття, а технологічне вдосконалення також забезпечує спеціалізовані дослідження згортання крові, які контролюють різні фази цього процесу. Конкретний моніторинг згортання на місці буде набувати більш важливого значення в майбутньому, оскільки гемостатичні втручання стають все більш доступними як концентрати похідних із плазми або рекомбінантних факторів на додачу до звичайної свіжозамороженої плазми та кріопреципітату. Подальша перевірка і використання відповідних моніторів згортання крові, швидше за все, допоможе нам покращити наше розуміння та управління збалансованою гемостатичною та антитромботичною функціями в згортанні крові [22].

Коагулограма – це коли беруть кров, при підозрі на різноманітні захворювання пов'язані із згортальною функцією, для комплексного дослідження. Завдяки, таким аналізам можна виявити або запобігти появі нових

хворобливих станів: в першу чергу це стосується кровотечі або утворення тромбів [4].

Коагулограма містить наступне в своєму складі: фібриноген, протромбіновий час, протромбіновий індекс, міжнародне нормалізоване відношення, активований частковий тромбoplastинований час [3].

Також, коагулограма містить додаткові тести, які теж мають клінічне значення. До таких тестів відносяться: протеїн С; антитромбін III, вовчаковий антикоагулянт (ВА), Д-димер, рефракція ретракції кров'яного згустку, еластограма, тест тромбодинаміки, розчинні фібрин-мономерні комплекси, толерантність плазми до гепарину, час рекальцифікації плазми [37].

Показники цих тестів в нормі (Таблиця 1.4) [37] і при патології суттєво відрізняються, також деякі показники, при нормальному функціонуванні крові, взагалі не спостерігаються.

Таблиця 1.4

**Коагулограма (гемостазіограма): розшифровка**

Параметри	Найменування показників	Норма для дорослих	Норма для дітей
Активований частково тромбoplastинований час	АЧТЧ	24 – 34 с	24 – 34 с
Фібриноген		2 – 4 г / л	2,70 – 3,60 г / л
Протромбіновий час	ПТЧ	11 – 18 с	Недоношені 13 – 18 с Перші 185 днів життя 12 – 16 с ≤ 5 років 14 – 17 с ≤ 15 років 11 – 15 с
Тромбоцити		180 – 320 * 10 <sup>9</sup> / л	150 – 350 * 10 <sup>9</sup> / л
Протромбіновий індекс	ПТІ	80 – 120 %	75 – 100 %

Продовження таблиці 1.4

Д - димер		До 0,78 мг / л Вагітні 1 триместр – 1,1 мг / л 2 триместр – 2, 1	0,8 мг / л
-----------	--	---	------------

		мг / л 3 триместр – 2,7 мн / л	
Тромбіновий час	ТЧ	15 – 18 с	15 – 18 с
Антитромбін III	АТ III	75 – 125 %	Новонародженні 40 – 90 % До 6 років 80 – 140 % Від 6 до 11 років 90 – 130 % 11 – 16 років 75 – 135 років
Реакція кров'яного згустку	РКЗ	40 – 95 %	35 – 85 %
Час рекальцифікації плазми	ЧРП	1 – 2 хв	1 – 2 хв
Розчинні фібринмономерні комплекси	РФМК	3,35 – 4,0 мг / 100 мл плазми	3,0 – 3,5 мг / 100 мл плазми

Дисемінована внутрішньосудинна коагуляція (ДВЗ) є поширеною проблемою у госпіталізованих пацієнтів. Умови, пов'язані з ДВЗ-інфекцією, включають: сепсис або важка інфекція (будь-які мікроорганізми), деструкція органу (наприклад, панкреатит), злоякісна пухлина, включаючи солідні пухлини та гематологічні злоякісні новоутворення (наприклад, лейкемія, мієлопроліферативне новоутворення), травми (наприклад, політравма, нейротравма, жирова емболія), вагітність (включаючи емболію навколоплідних вод, абрупцію плаценти, прееклампсія), судинні аномалії (наприклад, Синдром Касабаха-Мерріта, великі судинні аневризми), важка печінкова недостатність, важка токсична або імунологічна реакції (наприклад, зміїні укуси, рекреаційні наркотики, реакції трансфузії, відторгнення трансплантата) [22].

ДВЗ - це синдром, який характеризується системною активацією згортання крові, що призводить до внутрішньо судинного тромбін і фібриновий згусток, які можуть спричинити порушення мікросудин і генерує дисфункцію

органів та кровотечі. Патогенез ДВЗ виникає через дисбаланс між нормальними прокоагулянтними та антикоагулянтними шляхами [38].

Лабораторні результати включають: тромбоцитопенію, фрагментацію гемолітичної анемії на периферичній мазок крові, збільшення продукту розпаду фібрину (FDP), підвищений D-димер, подовжений протромбіновий час (PT) і активований частковий тромбoplastиновий час (aPTT), зменшення концентрації фібриногену та концентрація білка С [39].

Тромбоцитопенія, тромбоцити менше  $50 \times 10^9 / L$ , було виявлено приблизно у 50% пацієнтів. Ступінь тромбоцитопенії корелює з генерацією тромбіну. Тому одноразова оцінка визначення кількості тромбоцитів як нормального рівня кількості тромбоцитів ( $150-400 \times 10^9 / L$ ) як було показано не надають ніякої вигоди [11].

ДВЗ може посилити утворення тромбіну, збільшити фібринолітичну активність та продукти розпаду фібрину, і збільшити D-димер. Однак ПВП метаболізуються печінкою і секретується нирками. Таким чином, пацієнти з порушеннями функції печінки або нирок рівень ПВП зростає [22].

У більшості пацієнтів з ДВЗ спостерігається подовження PT та aPTT. PT подовжується при 50-75% ДВЗ пацієнтів. АРТТ подовжується у 25-50% випадків. Приблизно 50% пацієнтів, у яких були діагностуванні ДВЗ-синдром демонструють нормальний рівень або навіть скорочені від PT та aPTT, вони можуть відбуватися з циркулюючими активованими факторами, такі як тромбін або прискорення утворення тромбіну. Нормальний PT та aPTT не виключають стимуляції системи коагуляції. У хворих при підозрі на ДВЗ-інфекцію також може бути час тромбіну (TT) нормальний або підвищений [38].



## РОЗДІЛ 2

### ОРГАНІЗАЦІЯ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Організація дослідження

Для проведення дослідження, використовувалися білі миші, а саме лінії BALB, масою 23 – 27 г. Під час проведення експерименту піддослідні тварини знаходилися у віварії при стандартних умовах, їх мешкання, та на стандартному харчуванні. Білі миші в яких спостерігались певні патології в експерименті участь не брали. Дослідження проводили при дотриманні етичних правил відповідно з Першим національним конгресом України з біоетики та «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» [2].

При гематологічних дослідженнях всі маніпуляції проводили з дотриманням принципів операційних процедур Центру, який був розроблений відповідно до рекомендацій та правилам Належної лабораторної практики (GLP).

Схема дослідження проводилась в наступному порядку. Піддослідні білі миші були розділені по 3 групи, в кожній з яких, знаходилось по шість тварин: 2 експериментальні і одна контрольна досліджуванні групи. До експерименту брали статевозрілих мишей, самців. Тваринам контрольної та (I) експериментальної групи у черевну порожнину вводили еритроцитарну масу (яка була приготовлена за 30 хв до введення) в об'ємі 0,5 мл. Еритроцитарну масу вводили для імунізації піддослідних тварин, а також вводили диметилсульфоксид та 0,9% розчин NaCl. У (I) експериментальній групі вводили ДМСО разом з еритроцитарною масою, 0,9% розчин NaCl та CORM-2. Після стежили за продуктивною фазою, яка відбувалася на третю добу: перш за все, брали кров з кінчика хвоста для дослідження; виміряли антропометричні дані які були проведені до початку експерименту з тваринами. Пізніше вводили розчин (0,5 мл) CORM-2, який було розведено у диметилсульфоксиді іншій

експериментальній групі (II). На 6-й день збирали антропометричні дані, та збирали кров для дослідження (ІФ-аналіз, робили мазки крові), також брали кістковий мозок методом відбитків [2].

## **2.2. Методи, які використовувалися під час дослідження**

Після введення досліджуваних речовин, через 3 дні та через 6 днів брали кров для дослідження. Кров брали шляхом часткової ампутації хвоста, при цьому дотримувались всіх правил асептики. Тобто, піддослідну тварину поміщали в мишотримач, і пропускали її хвіст через дірочку, при цьому обробляючи теплою водою, щоб відбувалось розширення вени. Захопивши мишотримач з мишкою, притримуючи при цьому хвіст великим і вказівним пальцем [2].

Далі ампутували декілька міліметрів хвоста і зразу збирали кров до епіндорфа, роблячи масажуючі рухи пальцями вдовж хвоста від центру до кінчика хвоста. Об'єм збираної крові становив 0,5 мл.

Пізніше затискали кінчик хвоста піддослідної тварини тампоном з перекисом водню (3 % розчин). Відразу проводили дослідження, центрифугували, спостерігали за часом згортання крові, робили мазки крові.

Для визначення часу згортання крові, використовували методику Бюркера, брали кров і змішували з дистильованою водою на годинниковому склі та за допомогою скляної палички відтягали й перемішували до появи перших ниток фібрину. Разом з тим заміряли час від взяття крові до появи перших ниток фібрин.

Кістковий мозок, вимивали з однієї стегнової кістки миші, перед тим піддавали гуманній евтаназії. Вимитий кістковий мозок використали для приготування зразків кісткового мозку методом відбитків.

Виготовлення мазків крові складається із певних етапів:

- каплю крові наносили на знежирене предметне скло і одним рухом розмазували;

- висушували і фарбували мазок за Паппенгейном.

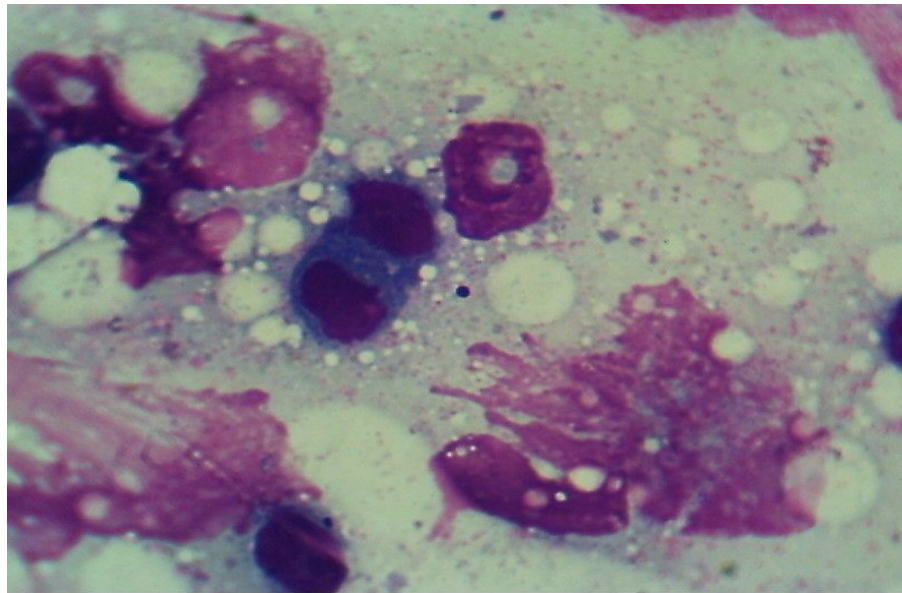
Під час дослідження, використовували статичний і графічний аналіз результатів із використанням програми Excel. Критичний рівень достовірності був прийнятий  $P \leq 0,05$  [2] .

## РОЗДІЛ 3

### АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 3.1. Кількісні показники попередників тромбоцитів у кістковому мозку під впливом донора монооксид карбону

В результаті дослідження мікропрепаратів кісткового мозку, піддослідних тварин, виявлено попередників тромбоцитів та їх достовірну кількісну зміну (рис. 3.1).

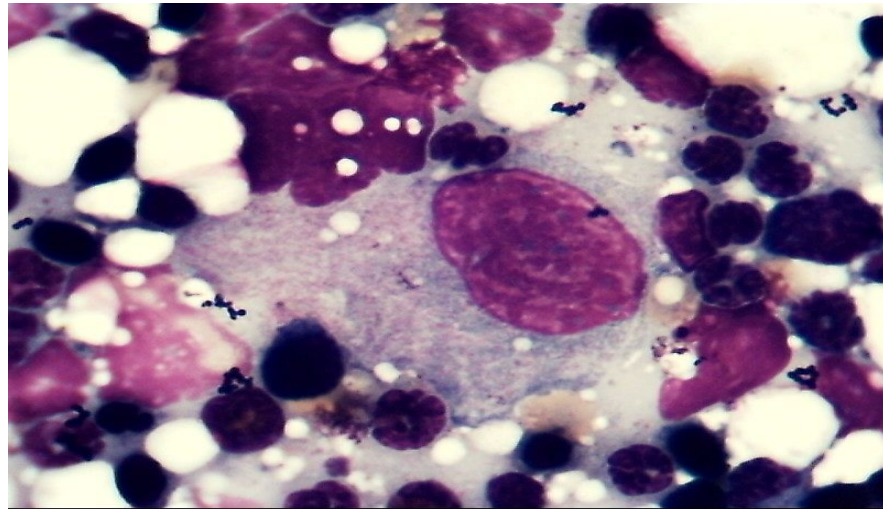


**Рис. 3.1. Промегакаріоцит у мікропрепараті кісткового мозку тварини, яка отримувала CORM – 2 (0,5 мл)**

При дослідженні червоного кісткового мозку було визначено і підраховано різні види попередників тромбоцитів у контрольних і піддослідних групах (рис. 3.2).

У тромбоцитів є декілька попередників, які формуються у кістковому мозку. Перед тим, як тромбоцити попадуть у судинне русло, вони проходять ряд метаморфозів. Перш за все, це утворення у червоному кістковому мозку мегакаріобласту, який фрагментується та перетворюється на промегакаріоцит.

Він у свою чергу, перетворюється у мегакаріоцит, який диференціюється в метамегакаріоцит, з якого і формується тромбоцит.

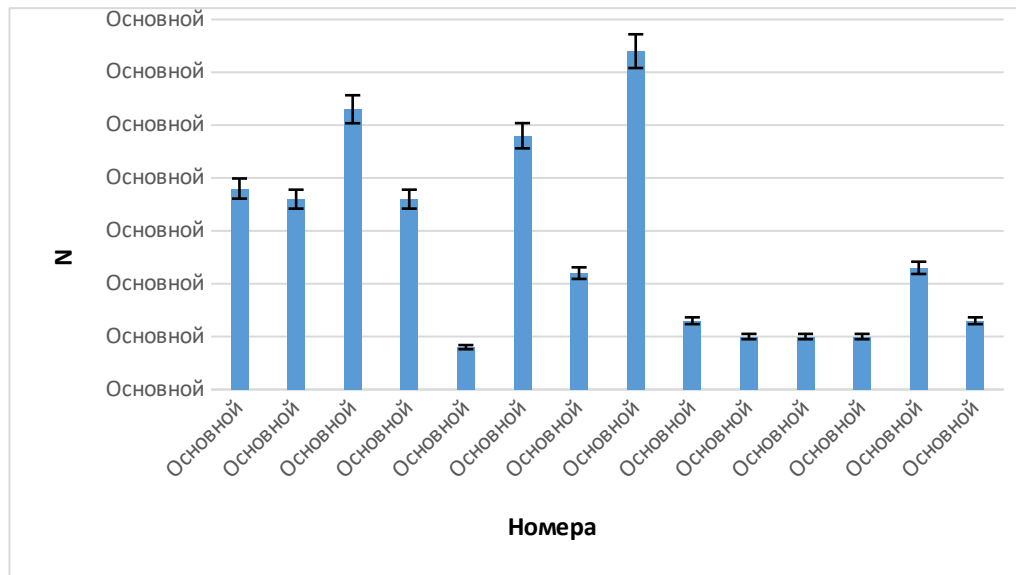


**Рис. 3.2. Мегакаріобласт у червоному кістковому мозку миші білої (контрольна група)**

Достовірну зміну кількості попередників тромбоцитів в контрольній і досліджувальній групі червоного кісткового мозку, можна побачити на графіку (рис. 3.3).

Відмінності, які відбулися між експериментальними групами, були виявлені та порівнянні із значенням контрольної групи. До контрольної групи увійшли значення з першого по четвертий номер (5 номер помер під час дослідження, а в 6 – му – було виявлено азурофільне вкраплення і дані відрізнялися від даних інших контрольних номерів).

В експериментальні групі I, в номерах №8 і 10 визначається підвищена кількість попередників тромбоцитів, відповідно 118% : 157% від контролю; в номерах № 9:11:12, спостерігається зменшення кількості – 54% : 32% : 25%. В групі експеримент II у всіх номерах значне зменшення протромбоцитів (25% : 56% : 32%).



**Рис. 3.3. Змінна кількості протромбоцитів у кістковому мозку піддослідних груп під впливом донора карбон монооксиду в червоному кістковому мозку**

Також, спостерігається, що на різних стадіях диференціації тромбоцитів у експериментальних і контрольних групах різна кількість клітин. Так, в контрольній групі у всіх номерах виявлена велика кількість мегакаріобластів, тоді як в експериментальних групах їх кількість зменшується. Але в експериментальних групах більша кількість мегакаріоцитів, метамегакаріоцитів і тромбоцитів.

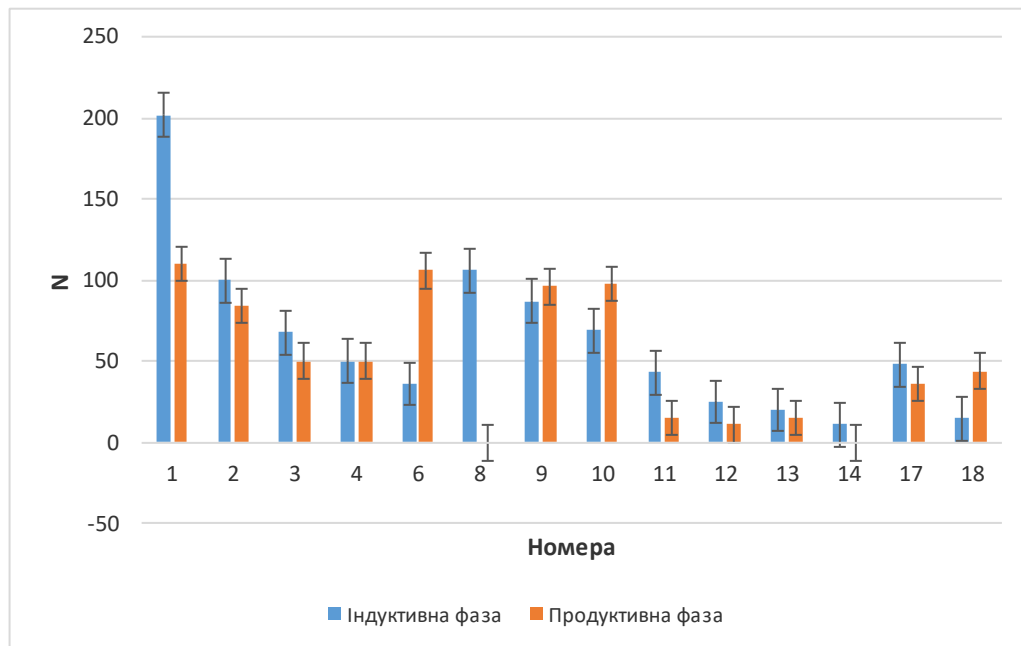
Відповідно до таких даних, кількість попередників тромбоцитів зменшується під дією донора монооксиду карбону, а також, можна припустити, що він стимулює швидкість диференціювання клітин попередників тромбоцитів.

### **3.1.1. Тромбоцити на периферії під впливом монооксид вуглецю.**

Донор монооксид карбону впливає не тільки на диференціацію клітин у кістковому мозку, він також впливає на показники периферичної крові, а саме на тромбоцити. Так, при досліджуванні тромбоцитів, багатофункціональних

клітин, спостерігали їх достовірну зміну в залежності від фази імунізації, зміни зазначені на графіку (рис. 3.4).

В індуктивній фазі збільшується кількість тромбоцитів у контрольних групах (окрім номера шість, в якого виявили виключення у вигляді розової грануляції), а також в експериментальній групі I №11, 12, 13 і експеримент II - №17. В № 9, 10, 18 спостерігається домінування в кількості тромбоцитів продуктивної фази над індуктивною.



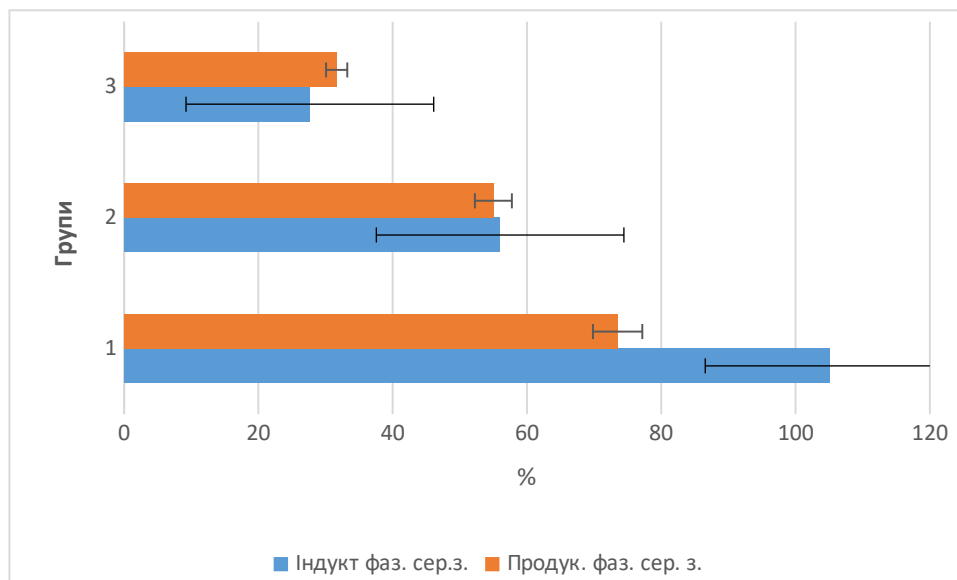
**Рис: 3.4. Кількісна характеристика тромбоцитів у двох фазах під впливом CORM-2**

Також, у №8 відсутня продуктивна фаза (оскільки піддослідна тварина померла під час дослідження), а в досліджуваному №14 не виявлено тромбоцитів в продуктивній фазі.

Під час порівняння середніх значень, в індуктивній і продуктивній фазах, спостерігається зменшення синтезу тромбоцитів у експериментальній групі I і II у порівнянні з контрольною групою. В експериментальній групі I в індуктивній фазі кількість тромбоцитів (у порівнянні з контролем) зменшується

і становить 53,3 %, а в продуктивній – на 74,8 %. Тоді як, в експериментальній групі II ці дані становлять відповідно 26,4 % : 43,1 %.

Виходячи з даних експеримента I і контролю, індуктивної і продуктивної фази, можна сказати що кількість тромбоцитів зменшилось відповідно на 46,6% : 25,2 %, а в експериментальній групі II – на 73,6% :56,9%, ці дані відображені на графіку (рис. 3.5.).



**Рис. 3.5. Кількість тромбоцитів в мазку крові контрольної та експериментальної групи у відсотковому співвідношенні**

При порівнянні двох експериментальних груп виявлено поступове зниження тромбоцитів у всіх фазах експериментальної другої групи; у індуктивній на 50,6 %; в продуктивній на 42,4%. А в результаті порівняння індуктивної і продуктивної фаз у всіх досліджуваних груп, виявлено, що в контрольній і в експериментальній групі I тромбоцитів більше в першій фазі (відповідно в контролі на 30%, а у групі I – 1,8%). Тоді як, в експериментальній групі II тромбоцитів більше у другій фазі на 12,6%.

В результаті дослідження, можна зробити наступний висновок, що донор монооксид вуглецю здатний вплинути на кількість тромбоцитів, як в індуктивній так і продуктивній фазі. В індуктивній фазі CORM - 2 буде



впливати на зменшення тромбоцитів, тоді як в продуктивні фазі їх кількість буде поступово збільшуватися.

### 3.2. Вплив монооксид вуглецю на згортальну функцію крові

Кров, яку брали у піддослідних тварин, одразу досліджували на показники протромбінового часу та визначали протромбіновий індекс, дані наведені в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

#### Показники протромбінового індексу в досліджувальних групах

Протромбіновий індекс (мм/мс)		
Контроль	Екс – I	Екс – II
1:55 ± 0,04	0:30 ± 0,01	0:02± 0,01
2:57 ± 0,04	0:23 ± 0,01	0:03± 0,01
0:36 ± 0,04	0:06 ± 0,01	0:02± 0,01
2:45 ± 0,04	0:04 ± 0,01	0:08± 0,01
0:08 ± 0,04	0:09 ± 0,01	

Виходячи з даних, можна зробити висновок, що монооксид вуглецю вплинув на протромбіновий індекс і чим раніше вводили даний препарат, тим повільніший відбувалася коагуляція, і навпаки, чим пізніше – тим швидший протромбіновий час; на діаграмі (рис. 3.6) показана ця закономірність.

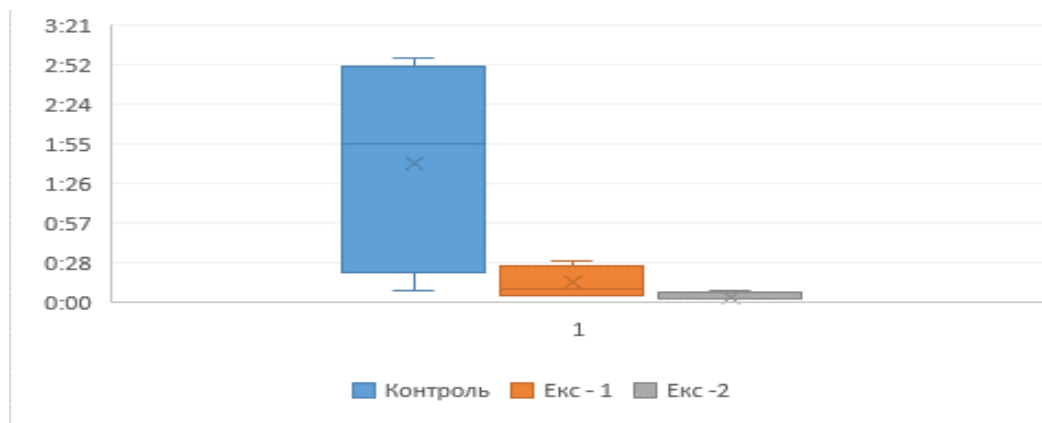


Рис. 3.6. Діаграма зміни протромбінового часу досліджуваних груп

Під час дослідження, також визначили протромбіновий індекс між досліджуваними групами та контрольною. Так, в експериментальній групі I він становить 11,7 мм / мс, а другій групі становить – 3,04 мм / мс, звідси виходить, що індекс часу згортання крові у експериментальній групі I більший за експериментальну групу II на 73,96%.

Отже, дане дослідження показує вплив CORM-2 на згортальну функцію крові, показує різну функціональність даного препарату і безпосередній вплив на кровотворення.

Під час досліду, з експерименту вибули досліджуванні миші (померли) №5, 7, 15, 16.

1. Завдяки особливій будові молекули CO, він впливає на органи і систему органів в організмі. Загалом було досліджено його позитивну і негативну функцію. При високих концентраціях чадного газу відбувається негативний вплив, такий як накопичення метгемоглобіну, виникнення окисного стресу в клітинах та ін. Недавні дослідження виявили потужний протизапальний ефект CO: пригнічення вироблення протизапального цитокіну після стимулюючих стимулів; також може брати участь у клітинних захисних механізмах, стимулювати синтез мастоцитів.

2. Порушений баланс між прокоагулянтами та антикоагулянтами системи згортання крові може призвести до протромботичних подій та пов'язаної з ними захворюваності та смертності. Тромбози можуть бути викликані надлишковою функцією факторів прокоагуляції або неможливістю антикоагулянтних білків пригнічувати реакцію коагуляції. Ці стани можуть бути наслідком фізіологічних змін (наприклад, старіння), спадкових причин, набутого стану хвороби (наприклад, атероматозна хвороба, рак, антифосфоліпідний синдром), лікарських засобів (наприклад, стероїдні гормони) та ятрогенних причин (використання стенту).

3. Відповідно до даних які отримали, після уведення CORM-2 у кістковому мозку відбулись зміни кількості попередників тромбоцитів. CORM-2 впливає на диференціацію клітин у кістковому мозку та їх кількість. Монооксид вуглецю знижує кількість протромбоцитів, але в експериментальних групах від пришвидшує їх диференціацію, наприклад, зустрічається мало мегакаріобластів, а в контрольних - навпаки.

4. Донор монооксиду вуглецю впливає на периферичну кров. Після імунізації спостерігається зменшення кількості тромбоцитів в індуктивній і продуктивній фазах імунної відповіді. Відразу після введення CORM-2 спостерігається різке зменшення тромбоцитів, а в продуктивній фазі – їх поступове збільшення.

5. CORM-2 впливає на згортальну функцію крові. При дослідженні виявлено, що протромбіновий час і протромбіновий індекс зростає в залежності від часу введення монооксиду вуглецю в кровоносне русло. Чим пізніше був уведений CORM-2, тим більшим є протромбіновий час і навпаки - чим раніше, тим менше виражений час згортання крові та індекс.

## СПИСОК ВИКОРОСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бокарев І. Н. Воспаление и гемокоагуляция. Клиническая медицина, 2017. №2. 7-11 с. – URL: <https://rucont.ru/efd/58026>.
2. Височанська М. В., Бесчасний С. П., Лебідь А. Є. Вплив на активність мастоцитів кісткового мозку. Молодь і поступ біології: збірник тез доповідей XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів, присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету Львівського національного університету ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача. Львів, 2020. 222 с.
3. Запорожан В. М., Напханюк В. К, Горянова Н. О. Атлас: Морфологія клітин крові лабораторних тварин і людини: навч. пос. Одеса: ОДМУ, 2002. 118 с. – DOI: <https://studfile.net/preview/6696983/page:2/>.
4. Козинець Г., Стуклов М., Тюріна Н. Книга по гематології. М.: Практична медицина, 2016. 336 с. – URL: <https://www.yakaboo.ua/ua/uchebnik-po-gematologii.html#tab-attributes>.
5. Козинец Г. И., Высоцкий В. В., Захаров В. В. Кровь и экология. М.: Мир. Практическая медицина, 2007. - ISBN: 5-98811-052-5.
6. Міщенко І. В., Павленко Г. П., Коковська О. В. Фізіологія системи крові: навчально-методичний посібник для студентів медичних вузів України. Полтава, 2019. 210 с.
7. Мищенко В. П., Мищенко И. В. Физиология системы гемостаза. Полтава: ООО«АСМИ», 2003. 124 с.
8. Павленко Г. П., Сухомлин Т. А., Петренко Р. В. Роль тромбоцитів у фізіології та патології легень. «Вісник Української медичної стоматологічної академії. Актуальні проблеми сучасної медицини», 2017. Том 17. Вип. 1(57): 315-319 с.
9. Рощупкін А. А. Вплив важких металів на живі організми. Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини: збірник тез доповідей V Міжнародної

науково – практичної конференції студентів та молодих вчених. Суми: СумДУ, 2017. 140 – 141 с.

10. Шевчук В. Г., Мороз В. М., Белан С. М. (та ін.). Фізіологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. закл: за редакцією В.Г. Шевчука. Вид 2. випр і допов. Вінниця: Нова Книга, 2015. 258-340 с.

11. Шиффман Ф. Дж. Посібник: Патолофізіологія крові. М.: Бин-Пресс, 2007. 448 с. – URL: <https://www.yakaboo.ua/ua/patofiziologija-krovi.html#tab-attributes>.

12. Adach W., Olas B. Carbon monoxide and its donors – their implications for medicine. FMC, 2018 Dec. - <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0215>.

13. Adach W., Olas B. The role of CORM-2 as a modulator of oxidative stress and hemostatic parameters of human plasma in vitro. PLoS One, 2017. 12(9):e0184787. – Published online: 10.1371/journal.pone.0184787.

and anti-oxidant properties. Free Radic Biol Med 28:289–309

14. Bajaj P., Joist J. H. New insights into how blood clots: implications for the use of APTT and PT as coagulation screening tests and in monitoring of anticoagulant therapy. Semin Thromb Hemos, 2007. 25 (4): 407 – 418. - <https://doi.org/10.1055/s-2007-994943>.

15. Brouard S., Otterbein L. E., Anrather J., Tobiasch E. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. J. Exp. Med, 2000. – doi: 192:1015–1026.

16. Chen C.Y., Kao C.Y., Lin P.J., Shiesh S.C. Carbon monoxide may enhance bile secretion by increasing glutathione excretion and Mrp2 expression in rats. J Chin Med Assoc, 2013. 76: 258–264.

17. Desmard M., Kelly S. D., Bouvet O., Morin D., Roux D. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) exerts bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* and improves survival in an animal model of bacteraemia. FASEBJ, 2008 Dec. - <https://doi.org/10.1096/fj.08-122804/>.

18. Gibbons S. J., Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. JP, 2004 April. - <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.056556/>.
19. Jasnos K., Magierowski M., Kwiecien S., Brzozowski T. Carbon monoxide in human physiology – its role in the gastrointestinal tract. Postepy Hig Med Dosw, 2014. 68: 101–109. - DOI: 10.5604/17322693.1087527.
20. Magierowska K., Magierowski M., Hubalewska-Mazgaj M., Sliwowski Z., Ginter G. Carbon monoxide released from its pharmacological donor, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, accelerates the healing of pre-existing gastric ulcers. Br J Pharmacol, 2017 Oct. 174(20): 3654–3668. - doi: 10.1111/bph.13968.
21. Magierowska K., Magierowski M., Surmiak M., Adamski J., Mazur-Bialy A. I. The protective role of carbon monoxide (CO) produced by heme oxygenases and derived from the CO-releasing molecule CORM-2 in the pathogenesis of stress-induced gastric lesions: evidence for non-involvement of nitric oxide (NO). Int J Mol Sci, 2016. 17: 442. - DOI: 10.5604/17322693.1087527.
22. Makruasi N. Treatment of Disseminated Intravascular Coagulation. Med Assoc Thai, 2015. 98 (Suppl. 10): S45-S51. – URL: <http://www.jmatonline.com>.
23. Morse D., Choi A. M. Heme oxygenase-1: The “emerging molecule” has arrived. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol, 2002. 27:8–16. - doi: 10.1165/ajrcmb.27.1.4862.
24. Motterlini R., Sawle P., Bains S. et al. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. FASEB J, 2004. 19(2): 284–286. - DOI: 10.1096/fj.04-2169fje.
25. Nielsen V. G. The anticoagulant effect of Apis mellifera phospholipase A2 is inhibited by CORM-2 via a carbon monoxide-independent mechanism. J Thromb Thrombolysis, 2020 Jan. 49(1): 100-107. - doi: 10.1007/s11239-019-01980-0. PMID: 31679116.
26. Omaye S. T. Metabolic modulation of carbon monoxide toxicity. Toxicology, 2002. Nov 15. 180(2): 139-50. - doi: 10.1016/s0300-483x(02)00387.

27. Otterbein L. E., Bach F. H., Alam J., Soares M., Tao Lu. H. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med*, 2000. 6: 422–428. - DOI: 10.1038/74680. pathways, role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro-
28. Piantadosi C. A. *Biological Chemistry of Carbon Monoxide. Antioxidants & Redox Signaling*, 2004 Jul. - <https://doi.org/10.1089/152308602753666316>.
29. Rodgers P. A., Vreman H. J., Dennery P. A., Stevenson D. K. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies. – *PMC*, 2001. Feb. 18(1):2-10. - PMID: 8209283.
30. Rose J. J., Wang L., Xu Q., Mc Tiernan C. F., Shiva S. *Carbon Monoxide Poisoning: Pathogenesis, Management, and Future Directions of Therapy. ATS journals*, 2016 June 25. - <https://doi.org/10.1164/rccm.201606-1275CI>.
- Ryter S, Tyrrell RM. 2000. The heme synthesis and degradation
31. Ryter S. W., Otterbein L. E. Carbon monoxide in biology and medicine. *BioEssays*, 2005. - <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bies.20005>.
32. Ryter S. W., Otterbein L. E., Morse D., Choi A. MK. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: Regulation and functional significance. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2002. 234/235. 249–263.
33. Ryter S., Tyrrell R. M. The heme synthesis and degradation pathways, role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro-and anti-oxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 2000. 28:289–309.
34. Ryter S. W., Alam J., Choi A. M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev*, 2006. 86:583–650. - doi: 10.1152/physrev.00011.2005.
35. Sener A., Tran K., Deng J. P. et al. Carbon monoxide releasing molecules inhibit cell death resulting from renal transplantation related stress. *J. Urol*, 2013. 190. 772–778. - DOI: 10.1016/j.juro.2012.12.020.



36. Stucki D., Krahl H., Walter M., Steinhausen J., Hommel K., et al. Effects of frequently applied carbon monoxide releasing molecules (CORMs) in typical CO-sensitive model systems – A comparative in vitro study. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020. – DOI: 10.1016/j.abb.2020.108383.
37. Tanaka, Kenichi A. MD, Nigel S. MD. Blood Coagulation: Hemostasis and Thrombin Regulation. *Anesthesia & Analgesia*, 2009 May. Volume 108. Issue 5. p 1433-1446. - doi: 10.1213/ane.0b013e31819bcc9c.
38. Wiedermann C. J., Kaneider N. C. A systematic review of antithrombin concentrate use in patients with disseminated intravascular coagulation of severe sepsis. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2006. 17: 521-6.
39. Xu X., Lin J., Fu F. Optical coherence tomography to investigate optical properties of blood during coagulation *J. of Biomedical Optics*, 2011. 16(9). 096002. - <https://doi.org/10.1117/1.3615667>.
40. Zakhary R., Poss K. D., Jaffrey S. R., Ferris C. D., Tonegawa S. Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *PNAS*, 2000 December 23. 94 (26):14848-14853. - <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14848>.