

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**LĒTINIO STRESO ĮTAKA TROMBOCITŲ AKTYVACIJOS ŽYMENŲ RAIŠKAI  
SVEIKŲ JAUNŲ IR VIDUTINIO AMŽIAUS VYRŲ GRUPĖSE**

Magistrantė IEVA BINKYTĖ

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo vadovas  
doc. dr. Rėda Matuzevičienė

\_\_\_\_\_  
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir  
laboratorinės medicinos katedros vedėja  
hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_  
(parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_  
Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

2017 m., Vilnius

## TURINYS

Santrumpos .....	4
ĮVADAS .....	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1. Trombocitai ir trombopoezė .....	7
1.2. Trombocitai hemostazėje ir trombozėje .....	8
1.3. Trombocitų aktyvacijos eiga .....	9
1.4. Trombocitų funkcijos uždegimo, imuniniuose, auglio formavimo, žaizdų gijimo procesuose .....	10
1.5. Trombocitų ir leukocitų diferenciacijos žymenys .....	12
1.6. Lėtinis stresas .....	14
1.6.1. Galima streso įtaka trombocitams.....	16
1.7. Trombocitų tyrimo metodai.....	16
1.8. Tėkmės citometrija .....	17
1.8.1. Tėkmės citometrijos principas .....	17
1.8.2. Tėkmės citometrijos taikymas tiriant trombocitus.....	19
1.8.3. Tėkmės citometrijos privalumai ir trūkumai trombocitų tyrimui .....	20
2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS .....	21
2.1. Tyrimo apimtis ir tiriamųjų atranka .....	21
2.2. Darbe naudotos medžiagos, prietaisai .....	21
2.2.1. Naudotos priemonės ir reagentai.....	21
2.2.2. Naudoti prietaisai .....	22
2.2.3. Naudoti monokloniniai antikūnai ir su jais konjuguoti fluorochromai.....	22
2.3. Tyrimo metodai .....	22
2.3.1. Kraujo ėminių surinkimas .....	22
2.3.2. Veninio kraujo tyrimas automatizuotu metodu.....	23
2.3.3. Trombocitų funkcinio aktyvumo tyrimai tėkmės citometrijos metodu.....	24
2.4. Psichosocialinio streso klausimynas.....	32
2.5. Statistinė duomenų analizė .....	32
3. REZULTATAI.....	33
3.1. Tiriamųjų antropometrinių duomenų ir biocheminių rodiklių laboratorinių tyrimų rezultatai .....	33
3.2. Veninio kraujo tyrimo automatizuotu metodu ir tėkmės citometru rezultatai.....	34
3.3. Rūkymo ir naktinio darbo įtakos rezultatai .....	35
3.4. Psichosocialinio streso klausimyno atsakymų rezultatai.....	41
3.5. Psichosocialinio streso įtakos trombocitų aktyvacijai rezultatai .....	42
3.6. Trombocitų skaičiaus ir kitų tirtų rodiklių tarpusavio ryšys .....	50

3.7. Tirtų žymenų ir agregatų ryšys su kitais tirtais rodikliais .....	51
3.8. Psichosocialinio streso klausimyno ryšys su trombocitų aktyvacijos žymenimis ir agregatais .....	53
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	54
IŠVADOS .....	58
SUMMARY .....	59
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	60
1 PRIEDAS .....	64

## Santrumpos

ADF – adenoizino difosfatas

APC – alofikocianinas

CD – diferenciacijos žymenys (angl. *cluster of differentiation*)

CD40L – CD40 ligandas

CRB – C reaktyvusis baltymas

DTL – didelio tankio lipoproteinai

FITC – fluoresceinoizotiocianatas

GP – glikoproteinas

K<sub>2</sub>-EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dikalio druska

KMI – kūno masės indeksas

LAMP – su lizosomų membranomis susijęs glikoproteinas

MPV – vidutinis trombocitų tūris

MTL – mažo tankio lipoproteinai

PBS – fosfatinis buferinis tirpalas

PCT – trombokritas

PDW – trombocitų pasiskirstymas pagal dydį

PE – fikoeritrinas

PerCP – peridinino chlorofilo baltymas

P-LCR – didelių trombocitų skaičiaus santykis su bendru trombocitų skaičiumi

PLT – trombocitų skaičius

PSGL-1 – P-selektino glikoproteino ligandas

TAG – triacilgliceroliai

TRAP – trombino receptorių aktyvinantis baltymas

VUL SK – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikos (VUL SK LMC – VUL SK padalinys – Laboratorinės medicinos centras)

vWF – Vilebrando faktorius

## IVADAS

Stresas yra kasdienio gyvenimo dalis, jis gali būti ūmus arba lėtinis. Ūmus stresas gali veikti pozityviai, padeda žmogui mobilizuotis, paruošia organizmą gynybiniam atsakui. Kur kas blogiau yra patirti lėtinį stresą, kuomet atsako į stresą sistema nuolat būna aktyvintoje būsenoje ir nepastebimai veikia silpniausias žmogaus kūno vietas.

Psichosocialiniai lėtiniai stresiniai veiksniai, tokie kaip socialinės paramos trūkumas, socialinė atskirtis, įtampa darbe, depresija, bei kiti, veikia neuroendokrininę, širdies ir kraujagyslių, imuninę, centrinę nervų sistemas, virškinimo traktą, kitas žmogaus organizmo sistemas ir biologinius procesus. Stresas sukelia endotelio funkcijos sutrikimus, uždegiminių citokinų gamybą, hemostazės procesų sutrikimus, mažina fibrinolizinę plazmos aktyvumą ir taip prisideda prie širdies ir kraujagyslių ligų vystymosi [1, 2, 3]. Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis iš visų mirties priežasčių mirtingumas būtent nuo širdies ir kraujagyslių ligų užima pirmąją vietą [4].

Siekiant įvertinti streso pasireiškimą dažniausiai tiriami tokie streso biožymenys, kaip kortizolis, seilių  $\alpha$  amilazė, interleukinas 6, navikų nekrozės faktorius  $\alpha$  ir C reaktyvusis baltymas. Streso poveikis vertinamas pagal tiriamojo asmens antropometrinius duomenis ar streso vertinimo klausimynus [5]. Nors seniai žinoma, kad stresas veikia širdies ir kraujagyslių sistemą, tačiau tyrimų apie streso įtaką trombocitams, kurie atlieka pagrindinį vaidmenį kraujotakos sistemos ligose, atlikta labai mažai [6]. Aktyvinti trombocitai taip pat dalyvauja uždegimo, angiogenezės, metastazavimo, bei kituose patologiniuose procesuose [7].

Žinoma, kad ūmaus streso poveikyje padidėja trombocitų – leukocitų agregatų kiekis, trombocitų aktyvumas, tačiau apie lėtinio streso įtaką trombocitams žinoma mažai [8]. Natūralu, kad tyrėjus domina trombocitų atsakas į stresą, kaip galimas naujas streso biožymuo. Siekiant išvengti streso sukeltų padarinių žmogaus sveikatai naudinga būtų nustatyti ar būtent lėtinio streso poveikis atsispindi trombocitų aktyvinimo procese. Tėkmės citometrijos atsiradimas hematologijoje leidžia atlikti tokius tyrimus ir yra geriausiai standartizuotas metodas tirti trombocitų funkcijas [9].

Šiame darbe magistrantė įsisavino tėkmės citometrijos metodiką trombocitų funkciniam aktyvumui nustatyti. Analizavo surinktus tiriamųjų rezultatus, savarankiškai vykdė statistinę duomenų analizę.

**Darbo tikslas:** įvertinti lėtinio streso poveikį trombocitų aktyvacijos žymenų raiškai sveikų jaunų (25 – 39 m.) ir vidutinio (40 – 55 m.) amžiaus vyrų grupėse.

**Darbo uždaviniai:**

1. Iširti ir palyginti trombocitų funkcinio aktyvumo žymenų CD63, PAC-1, CD107a, bei leukocitų – trombocitų agregatų raišką sveikų jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų grupėse tėkmės citometru.
2. Įvertinti lėtinio streso poveikį trombocitų funkcinio aktyvumo žymenų raiškai skirtingo amžiaus sveikų tiriamųjų grupėse.
3. Išanalizuoti trombocitų funkcinio aktyvumo žymenų sąsajas su kitais kraujo tyrimų rodikliais ir aterosklerozės rizikos veiksniais.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Trombocitai ir trombopoezė

Trombocitus dar 1882 metais atrado Giulio Bizzozzero [10]. Trombocitai yra mažiausios kraujyje cirkuliuojančios, išgaubtos disko formos, 2–3  $\mu\text{m}$  diametro, bebranduolės kaulų čiulpų ląstelių megakariocitų atplaišos. Kraujotakoje išsilaiko 7–9 dienas, maždaug 2/3 cirkuliuoja kraujyje, 1/3 saugomas blužnyje. Sveikame organizme trombocitų yra  $(150\text{--}400)\times 10^9/l$ , pagaminama apie  $1\times 10^{11}$ /per dieną. Seni trombocitai fagocituojami blužnyje ir kepenyse [9, 11]. Trombocitai yra metaboliškai aktyvūs ir turi tokias ląstelines struktūras, kaip Goldžio aparatas, mitochondrijos, endoplazminis tinklas, sudėtingas citoskeletas. Jiems būdinga atvira kanalėlių sistema – trombocite esanti kanalų sistema, sujungta su plazmine membrana, skirta medžiagų judėjimui tarp trombocito ir išorės [12, 13]. Trombocitai genominės DNR neturi, bet iš megakariocitų paveldi informacinę RNR, splaisosomos komponentus ir *de novo* sintetina mažą kiekį baltymų. Kiti trombocitams būdingi baltymai gali būti paveldėti iš megakariocitų ar absorbuoti iš aplinkinių skysčių, ypač plazmos [9, 14]. Baltymai reikalingi hemostazei, trombozei, natūraliai gynybai prieš infekcijas, ląstelių komunikacijai, angiogenezei, audinių gijimui [12, 15]. Trombocitai taip pat turi didelį rinkinį paviršiaus receptorių ir adhezijos molekulių, bei granules (žr. Lentelė 1.1) [12, 13, 14]. Receptoriai svarbūs signalo perdavimui, viduląsteliniam transportui, granulių turinio sekrecijai. Granulėse kaupiamos biologiškai aktyvios molekulės (minėtieji trombocitams būdingi baltymai), svarbios krešėjimui ir kitų ląstelių sutelkimui uždegimo vietoje [11].

**1.1 lentelė.** Trombocitų granulės ir jų turinys [11, 13].

Granulių pavadinimas	Granulių turinys
$\alpha$ granulės	Adhezijos baltymai, proteazių slopikliai, citokinai, chemokinai, krešėjimo faktoriai, fibrinolizės baltymai, augimo faktoriai ir kiti baltymai. Membranose P-selektinas.
$\delta$ arba tankiosios	ADF, ATF, GTF, GDF, $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , serotoninas, histaminas, katecholaminai
$\lambda$ arba lizosomos	Rūgščiosios proteazės, rūgščiosios glikozidazės, rūgščiosios fosfatazės, arilsulfatazės. Lizosomų membranose LAMP-1, LAMP-2.

Megakariopoezė yra procesas, kurio metu žinduolių organizme kaulų čiulpų osteoblastų nišoje esančios hematopoetinės kamieninės ląstelės diferencijuojasi į megakarioblastus, toliau į megakariocitų pirmtakus ir galiausiai į subrendusius poliploidinius megakariocitus. Toliau vyksta kitas procesas – trombopoezė, t.y. trombocitų gamyba iš subrendusių megakariocitų. Šio proceso metu subrendę megakariocitai migruoja link kraujagyslių nišos, kur pertvarko savo citoplazmą, iš kurios formuojasi ištįsusios pseudopodijos sudarančios protrombocitus. Šie per endotelio ląstelių sienelės patenka į cirkuliaciją jau kaip subrendę trombocitai. Megakariopoezės ir trombopoezės procesus kontroliuoja įvairūs citokinai ir augimo faktoriai, bei svarbiausias reguliatorius – trombopoetinas, palaikantis megakariocitų išgyvenamumą, proliferaciją ir diferenciaciją. Osteoblastų nišoje I tipo kolagenas slopina trombocitų gamybą. Kaulų čiulpų mikroaplinkoje esantis Vilebrando faktorius (vWF) sąveikauja su megakariocitų glikoproteino (GP) Ib-IX receptoriais, šis procesas svarbus trombocitų formavimuisi ir patekimui į kraujotaką [9, 16].

Yra duomenų, kad trombopoezė vyksta ir cirkuliacijoje, kai trombocitai dauginasi pumpuruodami ir išstumdami iš trombocitų mikrodaleles. Trombocitų mikrodalelės yra fosfolipidinės vezikulės, kurios pumpuravimosi būdu atsidalina nuo trombocitų plazminės membranos. Jose randami trombocitų žymenys: GPIIb-IIIa, GPIb, CD31, CD61, CD62 [12].

## **1.2. Trombocitai hemostazėje ir trombozėje**

Trombocitai pirmiausia asocijuojasi su hemostaze. Tai normali organizmo funkcija, apsauganti nuo nukraujavimo stabdant kraujo tekėjimą ir skatinant krešėjimą, bei nuo trombozės – palaikant skystą kraujo būseną per fibrinolizės procesus. Atsiradus kraujagyslės pažeidimui aktyvinami trombocitai ir inicijuojama pirminė hemostazė, kurios esmė – kraujavimo sustabdymas. Iš pažeistų audinių ir trombocitų  $\alpha$  granulių išsiskiria Vilebrando faktorius, taip pat atsidengia endotelio kolagenas. Dėl to vyksta sąveika tarp trombocitų ir pažeistos kraujagyslės sienelės, audinių. Sukaupiama daugiau trombocitų, kitų kraujo ląstelių ir formuojamas krešulys, kuris yra nestabilus. Toliau vyksta antrinė hemostazė, kurios metu krešulys sustiprinamas fibrino polimerais. Dalyvauja prokoagulantai, trombocitų išorinėje plazminėje membranoje ekspresuojantys neigiamo krūvio fosfolipidus [16, 17]. Po kelių parų vyksta fibrinolizė ir krešulys suardomas, atstatant normalią kraujotaką [11]. Formuojantis arteriniam trombu didėja trombocitų aktyvumo lygis, kurį galima išmatuoti pagal aktyvacijos žymenų raišką trombocitų paviršiuje, bei susiformavusius ląstelių agregatus [18]. Sumažėjusi trombocitų aktyvacija sutrikdo hemostazę ir gali lemti padidėjusį kraujavimą. Priešingai, aktyvacijos padidėjimas susijęs su trombotinėmis



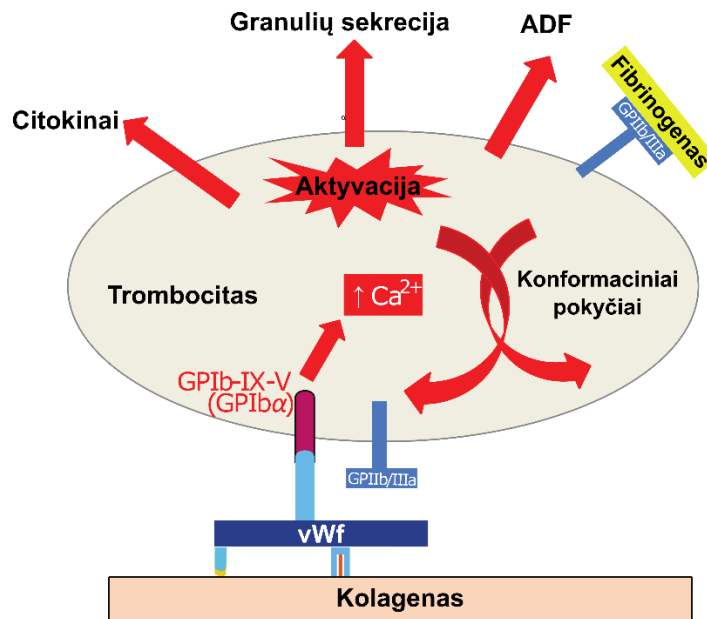
būklėmis, tokiomis kaip, miokardo infarktas, insultas ar kitos. Trombocitai yra pagrindiniai taikiniai išvengiant pasikartojančios širdies ir kraujagyslių sistemos trombozės [11].

### 1.3. Trombocitų aktyvacijos eiga

Normaliomis sąlygomis trombocitai cirkuliuoja kraujagyslėmis neaktyvioje būsenoje ir nesąveikaudami su endotelio ląstelėmis, nes šios išskiria sąveiką slopinančius mediatorius [9, 19]. Dinaminis kraujo tekėjimas išdėsto trombocitus išilgai kraujagyslių sienelių, dėl ko jie gali greitai sureaguoti į endotelio pažeidimus. Atsakas apima tris etapus: 1) iniciacija – trombocitų adhezija, 2) amplifikacija – trombocitų sukaupimas ir aktyvacija agregatų sudarymui, 3) stabilizavimas – stabilizuojamas krešulys. Esant kraujagyslių pažeidimui trombocitai aktyvinami ir jungiasi prie endotelio, nes susilpnėja slopinantis mechanizmas, ekspresuojamos adhezijos molekulės, įvairūs agonistai skatina adheziją. Atsakas vyksta per įvairius ląstelės paviršiaus receptorius – glikoproteinus. Kai kurie jų yra tiek ramybės būsenoje, tiek po aktyvacijos (pvz., CD41 [GP IIb/IIIa], CD42a [GPIX], CD42b [GPIb], CD61), kiti (pvz., aktyvintas IIb/IIIa, CD62P [P-selektinas], CD63, CD31 [PECAM], fibrinogeno receptoriai) priskiriami neoepitopams ir paviršiuje aptinkami tik aktyvintuose trombocituose [11, 20]. Trombocitams būdingi įvairūs receptoriai, priklausantys įvairioms baltymų ir glikoproteinų grupėms: integrinams, selektinams, tetraspaninams, transmembraniniams prostaglandinų, lipidų, imunoglobulinų superšeimos, tirozino kinazių receptoriams [7].

Trombocitų aktyvacijos keliai gali būti keli: dalyvaujant ADF, tromboksanui  $A_2$ , serotoninui, epinefrinui ar trombinui. Šie trombocitų receptorių agonistai jungiasi prie trombocitų, aktyvinti trombocitai keičia formą, kaupiasi, vyksta sąveikos tarp trombocitų – leukocitų ir trombocitų – endotelio, bei aktyvinama krešėjimo kaskada. Subendotelio dariniai kolagenas ir vWF sąveikauja tarpusavyje, o ši sąveika leidžia jungtis vWF su trombocitų GPIb-V-IX receptoriumi. Kolagenas gali sąveikauti su trombocitais ir tiesiogiai per GPVI. Dėl susidariusių jungčių padidėja vidinio  $Ca^{2+}$  koncentracija ir vyksta konformaciniai GPIIb-IIIa receptoriaus pokyčiai, granulių turinio sekrecija (1.1 pav.). Kaupiama ir aktyvinama daugiau trombocitų, fibrinogenas jungiasi prie aktyvių trombocitų ir stabilizuoja krešulį. Trombino vaidmuo svarbesnis pačiai hemostazei verčiant fibrinogeną į fibriną, nei trombocitų aktyvinimui [9, 21, 22]. Trombocitų – leukocitų agregatai, bei sąveika su endotelium susidaro šioms ląstelėms jungiantis į ląstelinius kompleksus vienos su kitomis per adhezijos molekules ir ligandus (pvz., P-selektinas

[CD62P] su PSGL-1, GPIIb/IIIa su Mac-1 ir CD40L su CD40) trombocitų, leukocitų ir endotelio paviršiuje [18, 23].



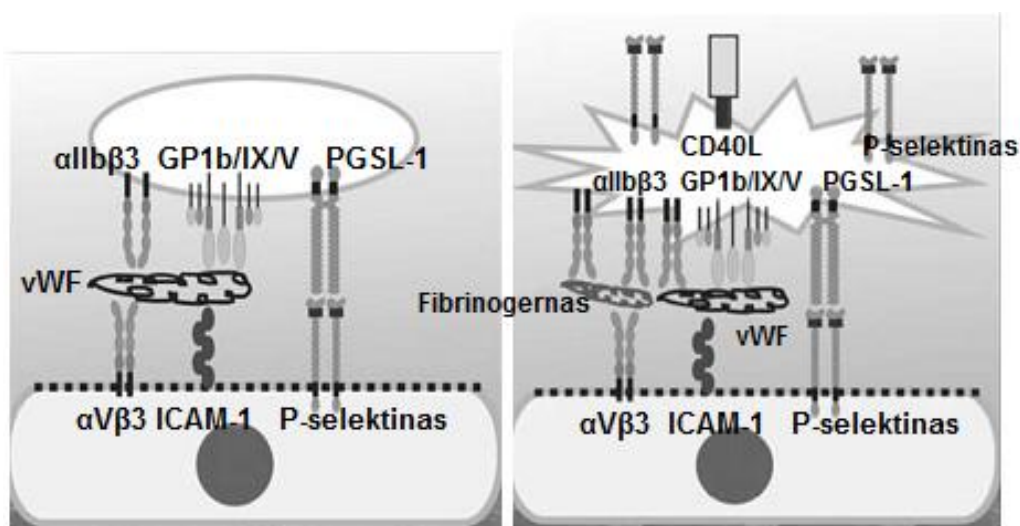
**1.1 pav.** Trombocitų sąveika su Vilebrando faktoriumi (vWF) ir aktyvacija [9].

Aktyvacijos metu sekretuojamas trombocitų granulių turinys, išsiskiria uždegiminiai mediatoriai, ekspresuojamos įvairios paviršiaus molekulės, taip praturtinama uždegiminė aplinka, aktyvinamas endotelis ir skatinamas leukocitų kaupimasis [24]. Vyksta trys egzocitoziniai procesai: tankiųjų granulių, alfa granulių ir lizosomų turinio sekrecija (žr. Lentelė 1.1). Šių procesų metu granulių membranos susilieja su plazmine membrana ir taip granulių vidinių membranų baltymai,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrinas, P-selektinas, CD63, CD40 ligandas, atsiranda ant trombocitų paviršiaus [25]. CD – diferenciacijos žymenų grupė (angl. *cluster of differentiation*) – tai ląstelių paviršiaus molekulės/baltymai/antigenai/žymenys, pagal kuriuos galima nustatyti ląstelės tipą ar subrendimo stadiją. Jie gali būti kaip receptoriai ar ligandai (molekulės, kurios aktyvina receptorius), gali veikti ląstelių signalo perdavime, adhezijoje, aktyvacijoje, slopinime. CD molekulės yra klasifikuojamos pagal tai kokie monokloniniai antikūnai prie jų jungiasi [26].

#### **1.4. Trombocitų funkcijos uždegimo, imuniniuose, auglio formavimo, žaizdų gijimo procesuose**

Pagrindine trombocitų funkcija laikoma hemostazė, tačiau jie atlieka daugiau fiziologinių funkcijų ir dalyvauja ne tik trombozėje, bet ir daugelyje kitų patologinių būsenų. Trombocitai per paviršiaus receptorius ir biologiškai aktyvias medžiagas, kurias kaupia granulėse

arba gauna iš plazmos, veikia uždegime, imuniniame atsake, žaizdų gijime, auglio formavimesi. Jie atpažįsta ir prižiūri į organizmą patekusius patogenus, atlieka šeimininko gynybos vaidmenį, veikia įgimto ir įgyto imuniteto atsake [19, 27]. Uždegimo vietoje mikroorganizmų membranų baltymai sąveikauja tiesiogiai arba per adhezijos baltymus (pvz., vWF, trombiną) su trombocitų membranos receptoriais  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, PSGL-1, ypač GPIb/IX/V kompleksu. Imunoglobulinai G atpažįsta bakterijų antigenus ir jungiasi prie jų, o Fc sritimi jungiasi prie savo receptorių trombocituose. Prie vWF jungiasi ir endotelio ląstelės per ICAM-1,  $\alpha$ V $\beta$ 3. Sąveikos aktyvina signalinius kelius, sekretuojamas tromboksanas A<sub>2</sub>, trombocitai tampa aktyvūs ir dalyvauja uždegiminiame atsake. Trombocituose pradedami ekspresuoti P-selektinas ir CD40L, todėl gali prisijungti imuninės ląstelės (monocitai, neutrofilai, limfocitai) per PSGL-1 ir CD40 (1.2 pav.). Jos ridenasi per trombocitus, migruoja per endotelio ląstelių jungtis į uždegimo sritį, kur iš granulių išskiria didelius priešuždegiminių, mikrobus naikinančių medžiagų kiekius. Išsiskyrę chemokinais skatina leukocitų migraciją, infiltraciją [28]. Kartu išsiskiria įvairūs augimo faktoriai (pvz., transformuojantis augimo faktorius [TGF], trombocitų kilmės augimo faktorius [PDGF], kraujagyslių endotelio augimo faktorius [VEGF]), kurie veikia žaizdų ir pažeistų kraujagyslių gijime. Kurdami tokį atsaką trombocitai prisideda prie su infekcijomis asocijuotų širdies ir kraujagyslių ligų, tokių būsenų kaip aterosklerozė, miokardo infarktas, insultas, vystymosi ir progresavimo [19].



**1.2 pav.** Kairėje pusėje matoma trombocito sąveika su pažeistu endotelium, dešinėje – sąveika kai trombocitas aktyvintas [11].

Nustatyta, kad CD40 ir CD40L raiška didėja aterosklerozinei plokštelei progresuojant, be to patys trombocitai ekspresuoja ir CD40L receptorių CD40, bet jo funkcija tiksliai nežinoma, manoma, kad veikia trombozės formavimesi, trombocitų – trombocitų sąveikose

[29]. Su pelėmis buvo pademonstruota, kad CD40L atlieka svarbų vaidmenį aterosklerozės iniciavime ir progresavime, per agregatų ir sąveikos su endotelium skatinimą. Esant CD40L trūkumui trombocitai formuoja mažiau stabilius agregatus [24].

Dar viena sritis kur trombocitai atlieka reikšmingą vaidmenį – piktybinio auglio formavimasis. Įrodyta, kad jie prisideda prie auglio ląstelių proliferacijos, metastazės, angiogenezės. Trombocitų ir auglio ląstelių sąveika yra dvipusė, piktybinės ląstelės ekspresuoja baltymus, aktyvinančius trombocitus, o šie būdami aktyvūs skatina auglio gyvybingumą ir progresiją. Kliniškai svarbu suprasti šias sąveikas, ar galima taikyti terapiją nesukeliant kraujavimo komplikacijų [30].

### 1.5. Trombocitų ir leukocitų diferenciacijos žymenys

**Integrinas  $\alpha$ IIb $\beta$ 3** (CD41/CD61) – dar žinomas, kaip glikoproteino IIb/IIIa kompleksas, aptinkamas tik trombocituose. Tai trombocitų aktyvinimo (adhezijos ir agregacijos) receptorių, kuris jungiasi prie fibrinogeno, fibrino, vWF, fibronektino, vitronektino ir trombospondino. Normoje šis žymuo aptinkamas ramybės stadijoje esančių trombocitų paviršiuje (apie 80000 – 100000 kopijų vienoje ląstelėje). Taip pat jo randama  $\alpha$  ir tankiosiose granulėse, o po jų turinio sekrecijos pernešamas į trombocitų plazminę membraną [7]. Po trombocitų aktyvacijos įvyksta konformaciniai šio žymens pokyčiai sukelti vidinio trombocitų signalo, kurį inicijuoja susiformavęs vWF/GPIb kompleksas.  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transformuojamas į aukšto giminingumo sąveiką su jo papildomais ląsteliniiais ligandais, o tai palengvina adhezijos baltymų prisijungimą. Tiriant trombocitų aktyvaciją naudojami PAC-1 antikūnai prieš fibrinogeno ar kitų medžiagų prisijungimo vietą  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 [31]. Šattil ir jo kolegų sukurti PAC-1 antikūnai šiomis dienomis yra komerciškai prieinami monokloniniai antikūnai, kurie specifiskai jungiasi tik prie aktyvios GPIIb/IIIa receptoriaus komplekso formos [32].

**CD61** arba GPIIIa – 110 kDa glikoproteinas, priklausantis integrinų šeimai. Trombocitų ir megakariocitų žymuo [20]. Tai integrino  $\beta$ 3 subvienetas, kuris su  $\alpha$ IIb grandine (CD41) trombocituose sudaro integriną  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ir ekspresuojamas kaip receptorių, kurio funkcija ląstelių adhezija. Taip pat gali sudaryti receptorių su CD51. Būdingas ir mieloidinių ląstelių pirmtakams, endotelio ląstelėms [33].

**CD42a (GPIX)** – trombocitų paviršiaus membranos glikoproteinas. Sudaro nekovalentinį kompleksą su GPIb, GPV. Susidaręs GPIb-IX-V (CD42a-d) kompleksas yra antras pagal dažnumą trombocitų receptorių (apie 50000 kopijų ląstelėje). Svarbus hemostazės ir trombozės iniciavime, yra receptorių vWF ir trombinui, svarbus trombocitų adhezijai prie

pažeisto endotelio, didina jų atsaką į trombiną. CD42a gali būti pakitęs sergant tam tikromis ligomis [33, 34].

**CD63**, dar vadinamas su lizosomų membranomis susijęs glikoproteinas 3 (angl. *LAMP-3*) – 53 kDa dydžio baltymas, ramybės stadijoje esančių trombocitų tankių granulių ir lizosomų membranose. Po aktyvacijos pernešamas į plazminę membraną ir šio žymens ekspresija parodo, kad trombocitai jau degranuliuo ir yra aktyvinti [35]. Dalyvauja signalo perdavime, kuris svarbus ląstelės aktyvacijos, augimo ir judėjimo reguliavime [33]. CD63 keičia trombocitų pasiskirstymą ir tirozino fosforilinimą ant prijungto fibrinogeno. Įrodyta, kad ši molekulė formuoja kompleksą su integrinu  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  ir CD9, o tai veikia kaip trombocitų aktyvacijos žymuo [35] ir galimai įtakoja sąveiką su neutrofilais. CD63 yra ypač patikimas žymuo trombocitų aktyvacijai *in vitro* tirti [36]. Nustatyta, kad CD63 ekspresija ypač padidėja sergantiems širdies ligomis, esant insultui, miokardo infarktui ir reikšmingai skiriasi nuo sveikstančiųjų ar sveikų asmenų. Imunofluorescencinė CD63 analizė tėkmės citometru gali atskleisti tankių granulių ir lizosomų skaičiaus pokyčius [37].

**P-selektinas**, CD62P –  $\alpha$  granulių membranos baltymas (angl. *GMP*), 140 kDa, ekspresuojamas trombocitų paviršiaus membranoje tik po aktyvacijos ir granulių degranuliacijos. Aktyvacijos metu paviršiuje ekspresuojama apie 13000 P-selektino molekulių. Šis žymuo taip pat randamas aktyvintame endotelyje ir leukocituose. P-selektinas tarpininkauja pirminėje adhezijoje tarp aktyvių trombocitų su monocitais ir neutrofilais, per P-selektino glikoproteino ligando (PSGL-1) receptorius leukocitų paviršiuje [38]. CD63 yra būtinas kofaktorius P-selektinui, kartu jie skatina leukocitų migraciją link trombocitų [39]. P-selektinas laikomas aukso standartu ir dažniausiai naudojamas trombocitų aktyvacijai vertinti [37]. Nepaisant to, nustatyta, kad *in vivo* cirkuliuojantys aktyvūs, degranuliuavę trombocitai greitai praranda P-selektiną nuo savo paviršiaus, nors ląstelės lieka cirkuliacijoje ir atlieka funkciją. Taigi šis žymuo nėra tobulas, nes juo identifikuojami ne visi aktyvinti trombocitai [1]. Tirti šį žymenį tėkmės citometru labiau patikima tada, kai vertinamas trombocitų funkcijos atsakas į ūmų, bet ne lėtinį stimulą [37].

**CD107a** arba LAMP-1 – 110 kDa su lizosomomis susijęs membraninis baltymas 1, integralinis lizosomų membranos glikoproteinas, randamas trombocitų lizosomose ir tankiosiose granulėse, trombocitų paviršiuje aptinkamas tik po granulių sekrecijos. Trombocitų aktyvacijos žymuo. Jo funkcija – tai trombocitų adhezija. Taip pat ekspresuojamas ant T limfocitų, eritrocitų, granulocitų, makrofagų, endotelio ląstelių, aktyvių neutrofilų [33, 7].

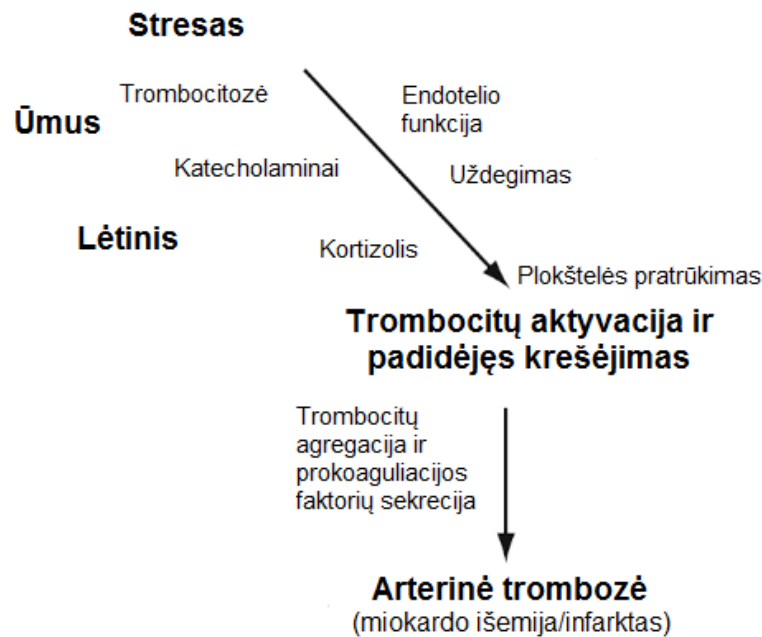
**Leukocitų žymenys. CD45** – tai fermentas tirozino fosfatazė, visų hematopoezės ląstelių, išskyrus eritrocitus ir trombocitus, žymuo. Ląstelių augimo ir diferenciacijos reguliatorius, būtinas B ir T ląstelių aktyvacijai. Būdingas T, B limfocitams, natūralių kilių (NK), dedritinėms

ląstelėms, bazofilams, granulocitams, makrofagams, monocitams, kamieninėms ląstelėms. **CD14** – monocitų/makrofagų žymuo, lipopolisacharidų ir juos surišančių baltymų kompleksų receptorių, kuris aptinka antigenines molekules mikroorganizmų paviršiuje. Taip pat būdingas granulocitams, makrofagams [33].

Tiriant babuinus *in vivo* buvo pademonstruota, kad trombocitai degranuliuoja per 1 minutę ir formuoja agregatus su neutrofilais ir monocitais. Agregatų su monocitais procentas yra didesnis nei su neutrofilais ir vidutinis *in vivo* cirkuliuojančių trombocitų – monocitų agregatų aptikimo laikas apie 30 min., kai agregatų su neutrofilais apie 5 min., o kaip anksčiau minėta P-selektino žymuo greit prarandamas ir palyginti trumpai aptinkamas cirkuliacijoje [40, 41]. Taigi daug jautresnis trombocitų aktyvacijos *in vivo* žymuo yra cirkuliuojantys monocitų – trombocitų agregatai [14, 42].

## 1.6. Lėtinis stresas

Lėtinis stresas – tai kasdienio gyvenimo dalis, tai stresas, kurį žmonės dažniausiai ignoruoja, tačiau nekontroliuojamas jis veikia mūsų sveikatą, organizmą ir imuninę sistemą. Lėtiniai stresiniai veiksniai gali būti išskirti į psichosocialinius veiksnius (pvz., žema socioekonominė padėtis, lėtinis kasdienio gyvenimo stresas, žemas socialinis aprūpinimas, socialinė atskirtis, įtampa darbe) ir psichologinį sielvartą (pvz., depresija, nerimas) [1, 43]. Visi minėti veiksniai veikia per tokius biologinius procesus kaip, padidėjusi hemodinamika, neuroendokrininės sistemos atsako stiprumas, kraujagyslių uždegimas, bei kiti. Trombocitų aktyvacija taip pat prisideda, nes yra ryšys tarp minėtų veiksnių ir trombocitų funkcijos [1]. Stresas sukelia endotelio funkcijos sutrikimus, uždegiminių citokinų gamybą, hemostazės procesų sutrikimus, o tai prisideda prie širdies ir kraujagyslių ligų vystymosi [2, 43]. Kai hemostazės procesas sutrikdomas arterinė trombozė gali sukelti miokardo infarktą, insultą ir kitas ūmias širdies ir kraujagyslių ligas, dėl aterosklerozinės plokštelės plyšimo ar endotelio disfunkcijos (1.3 pav.). Tiek ūmus, tiek lėtinis stresas veikia hemostazę, abu didina prokoaguliacijos žymenų aktyvumą, bet priešingai ūmiam, lėtinis stresas mažina fibrinolizinį aktyvumą. Be to lėtinis stresas skatina lėtinę padidėjusio krešėjimo būseną, taip didindamas trombotinių ligų riziką [3].



1.3 pav. Streso įtaka širdies ir kraujagyslių ligoms [3].

Veikiant stresui aktyvinama imuninė sistema ir skatinamas uždegimas. Aktyvinami streso ir uždegiminiai mediatoriai, keičiasi jų koncentracijos, o tai susiję su trombocitų funkcijos sutrikimu. Uždegimo mediatoriai C reaktyvusis baltymas, interleukinas 6 ar kiti naudojami nuspėti galimus susirgimus. Taigi vienas iš mechanizmų kaip psichosocialinis stresas lemia aterosklerozės išsivystymą yra imuninis/uždegiminis atsakas [44].

Vertinant stresą naudojami tokie žymenys, kaip kortizolis, seilių  $\alpha$  amilazė, uždegiminiai citokinai (interleukinas 6, navikų nekrozės faktorius  $\alpha$  ir C reaktyvusis baltymas) [5]. Įvertinti streso sukeltą trombocitų aktyvaciją galima matuojant trombocitų aktyvacijos žymenų raišką arba trombocitų – leukocitų agregatus [2].

Lėtinis stresas gali pasireikšti įvairiomis sveikatos problemomis, įskaitant raumenų skausmą, padidėjusį kraujo spaudimą, nusilpusią imuninę sistemą. Įrodyta, kad stresas prisideda prie daugelio susirgimų, tarp kurių ne vien širdies ligos, bet ir nutukimas, psichologinės problemos. Nepaisant iš aplinkos gaunamo streso žmonės dažnai kenkia savo sveikatai rūkydami, ar kitais žalingais įpročiais. Patiriant per daug streso svarbu keisti gyvenimo būdą, mažinti stresinę įtampą, kad būtų išvengta rimtų sveikatos problemų. Gerinti emocinę būklę padeda ramus kasdienis pasivaikščiavimas. Fizinis aktyvumas didina organizmo gaminamų endorfinų kiekį. Tai neuromediatoriai smegenyse, kurie padeda sumažinti nerimą ir įtampą. Taip pat labai svarbu sveika mityba ir pakankamas miego kiekis [45].

Žemesnio socioekonominio statuso žmonės (vertinant pagal užimamą darbo poziciją, išsilavinimą) patiria didesnę kasdienį stresą, nei priklausantys aukštesniam statusui, nes jų

prastesnė finansinė padėtis ir gyvenimo sąlygos, bei mažesnė socialinė parama [1]. Yra duomenų, kad atsakė į ūmų stresą padidėja leukocitų – trombocitų agregatų, bei sistolinis kraujo spaudimas, o tai rodo, kad agregatų atsaką valdo simpatinė nervų sistema [2]. Vertinant darbo sukeltą stresą nustatyta, kad agregatų daugiau susidaro įtemptu laikotarpiu, nei ramiu periodu [46]. Yra tvirtų įrodymų, kad depresija susijusi ir su lėtinėmis, ir su ūmiomis širdies ir kraujagyslių ligomis [47]. Būtų galima manyti, kad depresija turėtų būti susijusi su padidėjusiu trombocitų aktyvumu, tačiau yra gauta prieštaringų rezultatų. Padidėjusi trombocitų aktyvacijos žymenų (GPIIb/IIIa, P-selektinas) raiška nustatyta pacientams sergantiems sunkia depresija ir asmenims su depresijos simptomais. Priešingai, tiriant trombocitų agregaciją negauta jokių pokyčių arba netgi nustatytas agregatų sumažėjimas depresija sergantiems asmenims [48, 49].

### **1.6.1. Galima streso įtaka trombocitams.**

Psichologinis stresas aktyvina simpatinę nervų sistemą ir padaugėja katecholaminų epinefrino ir norepinefrino. Šie katecholaminai skatina trombocitų aktyvaciją *in vitro* ir *in vivo* [1]. Jie veikia padidindami trombocitų agregaciją, dydį, paviršiaus glikoproteinų, fibrinogeno receptorių, P-selektino raišką ir  $\alpha$  granulių produktų koncentraciją. Katecholaminai veikia per  $\alpha_2$  ir  $\beta_2$  adrenerginius receptorius trombocitų paviršiuje [1, 50].

Psichologinis stresas taip pat aktyvina pogumburio – hipofizės – antinksčių (PHA) ašį ir išskiriami gliukokortikoidai. Serotoninas, kuris glūdi trombocitų tankiosiose granulėse, skatina PHA ašies aktyvumą, o tai didina kortizolio kiekį plazmoje. Tiriant sveikus individus buvo nustatyta teigiama koreliacija tarp trombocitų serotonino koncentracijos ir plazmos kortizolio kiekio [43, 51].

### **1.7. Trombocitų tyrimo metodai**

Vienas iš pirmųjų prietaisų trombocitų aktyvacijai matuoti buvo agregometras, sukurtas Born, 1960 metais. Juo galima nustatyti savaiminę ir agonistais sukeltą trombocitų agregaciją trombocitais praturtintoje plazmoje [52, 53]. Šviesos agregometrijos metodas išmatuoja padidėjusią šviesos transmisiją trombocitų suspensijoje, kai trombocitai agreguoja. Metodas buvo laikomas aukso standartu, tačiau jo tikslumas mažas ir esant mažam trombocitų skaičiui rezultatus sunku interpretuoti. Mokslui vystantis atsirado jautresnių metodų, kuriuose naudojami lazeriai, o ne matoma šviesa [31, 54].



Trombocitų aktyvacijos žymenis galima iširti naudojant imunofermentinę analizę (ELISA) arba Western blot metodą. Jais matuojama trombocitų išskirtų produktų koncentracija kraujo plazmoje. Tačiau matuojamos medžiagos nėra patikimi rodikliai aktyvacijai vertinti, be to plazmos atskyrimas gali lemti trombocitų aktyvacijos artefaktą [14].

Šiuo metu geriausiai standartizuotas metodas tirti trombocitų funkcijoms yra tėkmės citometrija [55].

## **1.8. Tėkmės citometrija**

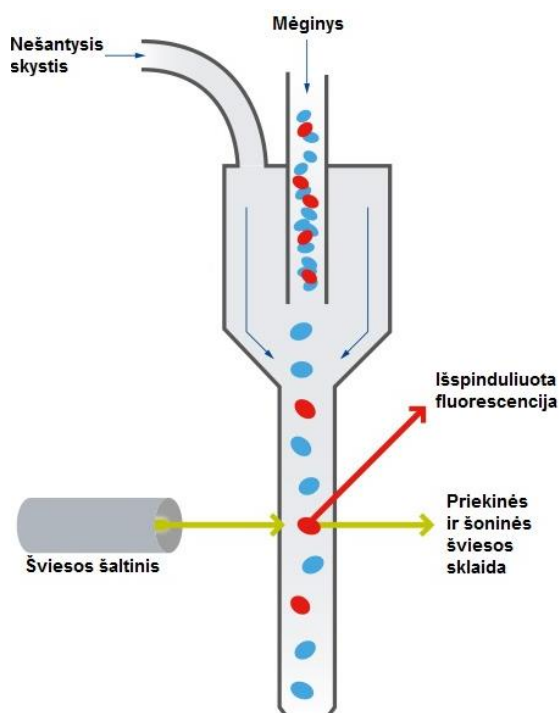
Tėkmės citometrija – greitas, tikslus ir jautrus metodas leidžiantis išmatuoti tokias ląstelių charakteristikas, kaip nukleorūgščių sudėtis, vidaus ir išorės žymenų raiška, kiekybiškai įvertinti ląstelės antigenus, atsparumą vaistams, membranos potencialą, mitochondrijas ir chromosomas, išmatuoti viduląstelinius pokyčius sąlygotus pH ar  $Ca^{2+}$  jonų. Taip pat metodas leidžia rūšiuoti ląsteles ir viduląstelinius komponentus. Tėkmės citometrija taikoma daugelyje medicinos sričių: imunologijoje, patologijoje, onkologijoje, genetikoje, klinikinėje biochemijoje, mikrobiologijoje ir hematologijoje. Pastarojoje yra ypač svarbi, nes idealiai tinka tirti kraujo ląsteles, išmatuoti jų kliniškai reikšmingus patofiziologinius ir funkcinus pokyčius. Tėkmės citometrijos naudojimas tiriant trombocitus yra vienas iš galimų šio metodo pritaikymų hematologijos srityje [56, 57].

### **1.8.1. Tėkmės citometrijos principas**

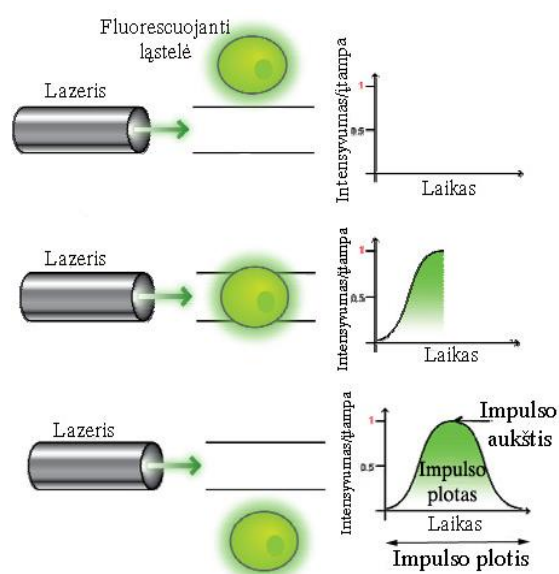
Tėkmės citometrijos metodas remiasi optiniu ir fluorescenciniu fizinių ir antigeninių ląstelių savybių įvertinimu. Nustatomas ląstelių dydis, vidinė sudėtis, agregacija su kitomis ląstelėmis, granulių sekrecija, paviršiaus receptoriai, jų konformaciniai pokyčiai susiję su aktyvacija [52].

Ląstelių suspensijai tekant tėkmės citometru vyksta hidrodinaminis fokusavimas, kai nešantis skystis, kurio viduryje yra suspensija, nukreipiamas į siaurėjančią angą. Taip ląstelės išrikiuojamos viena paskui kitą ir pavienės kerta šviesos šaltinio, kuris dažniausiai yra monochromatinės šviesos lazeris, spindulį. Kirsdamos lazerį ląstelės išskaido šviesą priklausomai nuo jų dydžio ir viduje, paviršiuje esančių struktūrų sudėtingumo (1.4 pav.). Išskaidytą šviesą surenka šviesos detektorių rinkinys, kurį sudaro priekinės šviesos sklaidos (PŠS) ir šoninės šviesos sklaidos (ŠŠS) detektoriai. Jie šviesinį signalą verčia įelektriniu, tai yra detektoriai siunčia užfiksuotą signalą į analoginio – skaitmeninio signalo keitiklį, kuris paverčia signalą į skaitmeninį

pavidalą. Ląstelei kertant šviesos šaltinį susidaro impulsas, kuris verčiamas įtampa. Ląstelės, kurių fluorescencija skiriasi turės skirtingus impulso aukščius, plotus ir plotį (1.5 pav.). Esant silpnam signalui elektriniai fotodaugintuvai jį sustiprina. Remiantis elektrinio impedanso ir PŠS principu nustatomas dalelių dydis, o ŠŠS principu – struktūrų sudėtingumas. Dažnai remiantis vien tuo galima atskirti ląstelių populiacijas [58].



1.4 pav. Hidrodinaminio mėginio fokusavimo schema [59].



1.5 pav. Elektrinio impulso susidarymas, ląstelei kertant lazerio išspinduliuotą šviesos pluoštą [59].

Monokloniniai antikūnai gaminami naudojant hibridomų technologiją [58]. Tai leidžia pagaminti antikūnus, kurie specifiskai jungiasi prie baltymų ląstelės paviršiuje arba viduje ir taip galima tiksliai identifikuoti ląsteles, įvertinti aktyvacijos būsenas. Naudojant keletą fluorochromų, kurių sužadavimo bangos ilgis toks pat, bet skirtingas išspinduliavimo bangos ilgis, galima vienu metu išmatuoti kelias ląstelės savybes [52].

### **1.8.2. Tėkmės citometrijos taikymas tiriant trombocitus**

Platus trombocitų paviršiaus glikoproteinų ištyrimas, nustatytos jų funkcijos, bei struktūros iki molekulinio lygmens ir galimybės naudoti skirtingus monokloninius antikūnus prieš juos, leidžia taikyti tėkmės citometriją trombocitų tyrimams [56]. Šiuo metodu galima įvertinti trombocitų aktyvaciją ir funkciją, tirti kraujyje cirkuliuojančių trombocitų CD žymenų ir receptorių ekspresiją, trombocitų – trombocitų ir trombocitų – leukocitų agregatus, granulių komponentus, trombocitų mikrodaleles, analizuoti trombocitų nukleorūgščių sudėtį, nustatyti retikulėtų trombocitų skaičių. Metodą galima gan plačiai pritaikyti diagnozuojant įvairias paveldimas ar įgytas trombocitų ligas, kurios yra susijusios su padidėjusia ar sumažėjusia žymenų raiška. Tėkmės citometrija taikoma gydymo sekimui, vaistų efektyvumui įvertinti, transfuzijoje, trombocitų koncentratų kokybės kontrolei, jų užteršimui leukocitais nustatyti, trombocitų kryžmiškumui aptikti [52, 60]. Taigi tėkmės citometrija šiuo metu yra geriausiai standartizuotas metodas tirti trombocitų funkciją.

Trombocitus galima stimuliuoti agonistais. Tai yra cheminės medžiagos, kurios susijungia su receptoriais esančiais ląstelių paviršiuje ir skatina fiziologines reakcijas [17]. Natūralūs agonistai gali būti adenozino difosfatas – ADF, kolagenas, arachidono rūgštis, trombino receptorių aktyvinantis baltymas (TRAP), serotoninas, tromboksanas A<sub>2</sub>, trombinas, epinefrinas, prostaglandinas, PAR-1 [37, 53].

Tiriami kraujo mėginiai gali būti fiksuojami arba ne. Jei nefiksuojama svarbu greitas apdorojimas, po kraujo surinkimo, nes tai lemia mažesnę aktyvaciją *in vitro* [61]. Jei apdoroti mėginių greitai neįmanoma, trombocitai fiksuojami, kad būtų išvengta iki analitinės aktyvacijos *in vitro*. Fiksuotas kraujas taip pat naudojamas kaip neigiama kontrolė trombocitų aktyvacijos žymenims nustatyti. Greitas fiksavimas ypač svarbus jei tiriami nuo laiko priklausomi trombocitų aktyvacijos pokyčiai. Nefiksavus trombocitai turi būti iširti per 2 valandas nuo surinkimo, o fiksavus 0,5 – 1,0 % formaldehidu arba paraformaldehidu (angl. PFA) galima tirti ir praėjus 2 valandoms [62]. Cahill su kolegomis parodė, kad trombocitų fiksacija formaldehidu prieš juos pažymint monokloniniais antikūnais, padidina CD62P ir CD63 žymenų ekspresiją, todėl teigia,

kad šis fiksatorius neturėtų būti naudojamas [63]. Jei trombocitai pirmiausia pažymimi antikūnais ir po to fiksuojami, CD41, CD62P žymenims tai įtakos neturi [61]. Taip pat teigiama, kad reikėtų vengti eritrocitų lizavimo ir per didelio centrifugavimo tiriant trombocitus, nes raudonųjų kraujo ląstelių lizės metu išsiskiria adenozindifosfatas (ADF) [64].

Taip pat trombocitų tėkmės citometrinei analizei svarbu antikoagulianto pasirinkimas. Vienas iš tinkamiausių antikoagulantų yra natrio citratas [64, 65]. EDTA ir heparinas gali veikti glikoproteinų struktūrą ir sukelti trombocitų aktyvacijos artefaktą. Buvo parodyta, kad mėginiuose su EDTA antikoagulantu buvo reikšmingai mažesnis skaičius CD41a teigiamų trombocitų, nei mėginiuose su natrio citratu [60]. Nustatyta, kad trombocitų žymenų CD41 ir CD61 neveikia inkubacija ar stimuliacija ADF. Nebuvo gauta jokių statistiškai reikšmingų skirtumų inkubuojant nuo 20 minučių iki 3 valandų [20].

### **1.8.3. Tėkmės citometrijos privalumai ir trūkumai trombocitų tyrimui**

Yra išskiriami tam tikri trombocitų tyrimo tėkmės citometru privalumai, lyginant su kitais laboratoriniais metodais. Tai pavyzdžiui: trombocitai analizuojami jų fiziologinėje būsenoje; reikalingas mažas tiriamo kraujo kiekis ir nėra priklausomybės nuo trombocitų skaičiaus; tuo pat metu galima tirti aktyvius ir ramybės būsenoje esančius trombocitus; greitas, tikslus ir labai jautrus metodas; išvengiama darbo su radioaktyviomis medžiagomis [60, 20]. Galima iš to paties mėginio gauti tarpusavyje susijusius matavimus apie kelias ląstelių savybes tiriant kelis antigenus. Minimalus trombocitų apdorojimas leidžia išvengti artefaktinės aktyvacijos *in vitro*. Dauguma trombocitų tyrimų galima atlikti visame kraujyje, nes tėkmės citometras geba tiksliai atskirti trombocitus, net kai jie užteršti eritrocitais ir leukocitais ir šie neįtakoja duomenų. Taigi nebūtinai trombocitais praturtintos plazmos paruošimas [56].

Nepaisant tėkmės citometrijos privalumų tiriant trombocitus, šis metodas reikalauja brangios įrangos ir prieinamų monokloninių antikūnų, bei patyrusių tyrėjų. Be to reikalaujama tirti šviežią, ką tik surinktą kraują, mėginiai negali būti saugomi ilgai trunkančioms analizėms, nepaisant galimybės fiksuoti trombocitus [31]. Mėginių paruošimas gana sudėtingas, jei mėginiai apdorojami nekruopščiai ir per greitai, klaidos iki analitinėje fazėje gali lemti artefaktus [52, 66]. Naudojant priekinės ir šoninės šviesos sklaidos metodą įvairios mažos dalelės įsiterpusios trombocitų populiacijoje apsunkina grynos trombocitų populiacijos atrinkimą. Geriau yra naudoti „gating“ strategiją atrenkant trombocitus pagal visada jų membranose ekspresuojamus antigenus (pvz., CD42b ir CD41). Tai leidžia atrinkti >99% grynumo trombocitų populiaciją ir išvengti supuolusių trombocitų ar jų agregatų su monocitais [17].

## 2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

### 2.1. Tyrimo apimtis ir tiriamųjų atranka

Magistro baigiamasis darbas rengtas Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro (VUL SK LMC) Hematologijos ir bendrosios citologijos laboratorijoje. Atliktas tyrimas yra projekto Nr. MIP-050/2015 dalis.

Tiriamieji asmenys (ūminėmis ir lėtinėmis ligomis nesergantys jauni (25 – 39 m.) ir vidutinio (40 – 55 m.) amžiaus vyrai) buvo atrinkti atsitiktinai iš VUL SK Šeimos centro duomenų bazės. Kraujo ėminiai buvo renkami 2015 – 2017 metais Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose (VUL SK) Laboratorinės medicinos centre iš laisvanoriškai ir sąmoningai tyrime sutikusių dalyvauti vyrų. Tiriamieji buvo informuoti jiems suprantama forma apie tyrimo tikslus, numatomą naudą, taikytinus metodus, tiriamojo teises, galimą riziką ar nepatogumus. Sutikimas buvo išreikštas pasirašant informuoto asmens sutikimo formą. Užtikrinant tiriamųjų konfidencialumą kiekvieno jų ėminiams buvo suteiktas identifikacinis kodas.

Tiriamiesiems buvo nustatyti antropometriniai rodikliai (svoris, ūgis, liemens apimtis), apskaičiuotas kūno masės indeksas (KMI), išmatuotas arterinis kraujo spaudimas, širdies susitraukimų dažnis, atlikti laboratoriniai kraujo tyrimai. Namuose dalyviai užpildė psichosocialinio streso vertinimo klausimyną.

Tiriamąją grupę sudarė 138 asmenys. 69 asmenys priklausantys jaunų (25 – 39 m.) vyrų grupei, jų amžiaus vidurkis 30,01 m.  $\pm$  3,68. Kiti 69 asmenys priklausantys vidutinio (40 – 55 m.) amžiaus vyrų grupei, amžiaus vidurkis 46,54 m.  $\pm$  4,40.

### 2.2. Darbe naudotos medžiagos, prietaisai

#### 2.2.1. Naudotos priemonės ir reagentai

- Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) (Cellwash, BD Biosciences, JAV);
- Fiksuojantis tirpalas (CellFix) (BD Biosciences, JAV);
- Lizuojantis buferinis tirpalas (Pharm Lyse) (BD Biosciences, JAV);
- Adenozino difosfatas (ADF) (Roche Diagnostics, Vokietija);
- Trombino receptorių aktyvinantis baltymas (TRAP) (Roche Diagnostics, Vokietija).
- Vakuuminiai mėgintuvėliai 4,5 ml su natrio citratu (3,2 %) (BD Vacutainer™, BD Diagnostics, JK)

- Vakuuminiai mėgintuvėliai 4,5 ml su K<sub>2</sub>-EDTA (BD *Vacutainer*<sup>TM</sup>, BD Diagnostics, JK)
- Citometriniai mėgintuvėliai Falcon (Corning, JAV)

### 2.2.2. Naudoti prietaisai

- Hematologinis analizatorius „Sysmex XE-5000“ (Sysmex Corporation, Japonija)
- Tėkmės citometras (BD FACSCanto<sup>TM</sup>, BD Biosciences, JAV), BD FACSDiva<sup>TM</sup> programinė įranga (versija 6.1.2, BD Biosciences, JAV)

### 2.2.3. Naudoti monokloniniai antikūnai ir su jais konjuguoti fluorochromai

Monokloniniai antikūnai pagal CD klasifikaciją (BD Biosciences, JAV)	Klonas	Konjuguotas fluorochromas	Specifiškumas
CD45	2D1	FITC	Leukocitų žymuo
CD14	MφP9	PE	Monocitų žymuo
CD42a	Beb1	PerCP	Trombocitų žymuo
PAC-1	PAC-1	FITC	Prieš fibrinogeno prisijungimo vietą aktyviuose trombocituose
CD61	VI-PL2	APC	Trombocitų adhezijos žymuo
CD107a	H4A3	FITC	Trombocitų aktyvacijos žymuo
CD63	H5C6	PE	Trombocitų aktyvacijos žymuo

## 2.3. Tyrimo metodai

Tiriamiesiems asmenims buvo atliktas automatizuotas veninio kraujo tyrimas, jame vertinti rodikliai: leukocitų skaičius, leukograma, trombocitų skaičius, trombocitų pasiskirstymo pagal dydį, vidutinio trombocitų tūrio, didelių trombocitų skaičiaus santykio su bendru trombocitų skaičiumi ir trombokrito rodikliai, bei atlikti trombocitų tėkmės citometrijos tyrimai, naudojant CD45, CD14, CD42a, CD107a, PAC-1, CD63, CD61 monokloninius antikūnus.

### 2.3.1. Kraujo ėminių surinkimas

Tyrimui imtas veninis kraujas, pagal VUL SK LMC taikomą standartinę procedūrą 02-2013 „Kraujo paėmimas iš venos“, laikantis standartizuoto ikianalizinio laboratorinio tyrimo

etapo reikalavimų. Kiekvienam tiriamajam veninis kraujas rinktas į 2 vakuuinius mėgintuvėlius: 3,5 ml į mėgintuvėlį su natrio citratu ir 3,5 ml į mėgintuvėlį su etilendiamintetraacto rūgšties dikalio druska ( $K_2$ -EDTA). Paėmus kraują mėgintuvėliai švelniais judesiais buvo vartomi (su Na citratu 3-4 kartus; su  $K_2$ -EDTA 8-10 kartų), kad kraujas susimaišytų su antikoaguliantu. Ėminio su  $K_2$ -EDTA mėgintuvėlis pristatytas automatizuotam veninio kraujo tyrimui, po to tas pats mėgintuvėlis su  $K_2$ -EDTA ir mėgintuvėlis su Na citratu pristatyti trombocitų tėkmės citometrijai. Mėgintuvėliai transportuoti per 30 minučių, vertikaloje padėtyje, kambario temperatūroje, vengiant didesnių temperatūros pokyčių ar mechaninio poveikio. Visi pristatyti ėminiai iš karto tirti atitinkamais metodais, prieš tai vizualiai patikrinant ar tinkamas antikoagulianto ir kraujo santykis (mėginio tūris) ir ar nėra krešulių.

### **2.3.2. Veninio kraujo tyrimas automatizuotu metodu**

Automatiniu hematologiniu analizatoriumi atliktas veninio kraujo tyrimas. Nustatyti kraujo rodikliai, iš kurių mūsų darbe nagrinėti: leukocitų skaičius [ $\times 10^9/l$ ] ir leukograma [% ir  $\times 10^9/l$ ], trombocitų skaičius [ $\times 10^9/l$ ] (PLT), trombocitų pasiskirstymas pagal dydį [fl] (PDW), vidutinis trombocitų tūris [fl] (MPV), didelių trombocitų skaičiaus santykis su bendru trombocitų skaičiumi [%] (P-LCR), trombokritas [%] (PCT). Trombocitų ir leukocitų indeksų normų vertės pateikiamos 1 priede, pagal VUL SK LMC.

Trombocitų reikšmės analizuotos eritrocitų (RBC) kanale, taikant hidrodinaminio fokusavimo metodą. Trombocitų skaičius (PLT) nustatytas impedanso metodu, kuris ląsteles suklasifikuoja pagal varžos pokytį tarp elektrodų. Dėl hidrodinaminio fokusavimo kraujas teka tarp dviejų elektrodų esančiu tarpu, kuris toks mažas, kad vienu metu pro jį prateka tik viena ląstelė. Elektrinis impedansas kinta ląstelei pratekėjus, jo pokytis yra proporcingas ląstelės dydžiui. Gauti duomenys grafiškai pavaizduojami trombocitų pasiskirstymo pagal dydį histogramoje (2.1 pav.).

Trombokritas (PCT) – tai procentinė trombocitų užimamo tūrio kraujyje išraiška. Trombocitų pasiskirstymas pagal dydį (PDW) apskaičiuojamas automatiškai nustatant žemiausią trombocitų atskyrimo pagal dydį ribą (PL) ir aukščiausią trombocitų atskyrimo pagal dydį ribą (PU). PL nustatoma tarp 2-6 fl, o PU tarp 12-30 fl. Pasiskirstymo plotis ties trombocitų pasiskirstymo pagal dydį grafiko viršūnės 20-ies procentų riba yra laikomas PDW. Grafiko viršūnės aukštis laikomas lygiu 100 %. P-LCR – tai didelių trombocitų, kurie viršija 12 fl ribą, ir bendro trombocitų skaičiaus santykis.

PDW apskaičiuojamas pagal formulę:

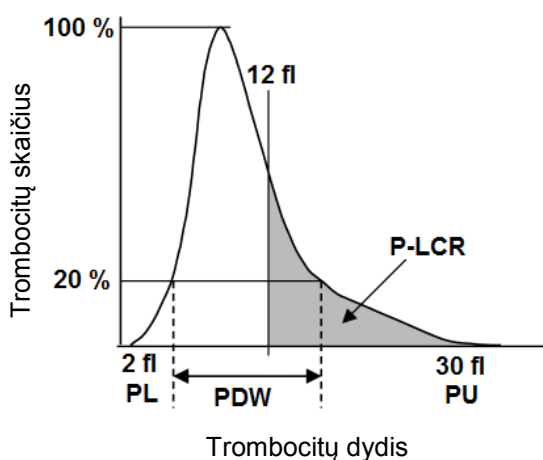
$$PDW = k \times sd/MPV$$

k – konstanta, sd – standartinis nuokrypis, MPV – vidutinis trombocitų tūris

MPV apskaičiuojamas pagal formulę:

$$MPV = \frac{PCT}{PLT} \times 10000$$

PCT – trombokritas, PLT – trombocitų skaičius



**2.1 pav.** Trombocitų pasiskirstymo pagal dydį histograma. PDW ir P-LCR apskaičiavimas. PL – žemiausia trombocitų atskyrimo pagal dydį riba, PU – aukščiausia trombocitų atskyrimo pagal dydį riba. X ašis vaizduoja trombocitų dydį, Y ašis trombocitų skaičių.

### 2.3.3. Trombocitų funkcinio aktyvumo tyrimai tėkmės citometrijos metodu

Trombocitų sekrecinis ir agregacinis aktyvumai tirti tėkmės citometrijos metodu. Tėkmės citometro, su kuriuo atlikti ėminių tyrimai, optinę sistemą sudaro sužadavimo šaltinis su trimis lazeriais (mėlynu, kurio sužadavimo bangos ilgis 488 nm, raudonu, kurio sužadavimo bangos ilgis 640 nm ir violetiniu, kurio sužadavimo bangos ilgis 405 nm). Šie lazeriai apšviečia mėginyje esančias ląsteles, o šviesos signalo surinkimo optikos sistema nukreipia šviesos išsibarstymą ir fluorescencijos signalus per specialus filtrus į detektorius. FACSCanto citometru galima išmatuoti 8 ląstelių parametrus: priekinę šviesos sklaidą (PŠS), šoninę šviesos sklaidą (ŠŠS) ir 6 fluorescencijas.

Tyrimo naudoti fluorochromai: fluoresceinoizotiocianatas (FITC), fikoeritrinas (PE), peridininio chlorofilo baltymas (PerCP) ir alofikocianinas (APC).

Tyrimo metu mėlynu lazeriu sužadinta fluorescencija matuota žaliame kanale naudojant FITC fluorochromą, geltoname kanale naudojant PE fluorochromą ir raudoname kanale



naudojant PerCP fluorochromą. Raudonu lazeriu sužadinta fluorescencija matuota raudoname kanale naudojant APC fluorochromą. FITC sužadavimo bangos ilgis 525 nm, o jo detektoriaus diapazonas 530/30 nm, atitinkamai PE – 575 ir 575/25 nm, PerCP – 678 ir 695/40 nm, APC – 660 ir 670/30 nm.

Naudojant programinę įrangą gaunami grafiniai vaizdai. Pasirinktas duomenų vaizdavimas taškinėmis diagramomis, kai vienas parametras (x ašyje) vaizduojamas kito (y ašyje) atžvilgiu. Priekinė šviesos sklaida (PŠS) atspindi ląstelės dydį, o šoninė šviesos sklaida (ŠŠS) ląstelės vidaus struktūrų sudėtingumą. Gautose taškinėse diagramose tam tikros tirtos ląstelių populiacijos išskirtos individualiai apibrėžiant jų regionus (angl. *gate*). Taip pat taškinės diagramos suskirstytos į kvadrantus, pagal kuriuos nustatomos ląstelių populiacijos su teigiama ir neigiama žymenų raiška.

Mėginio paruošimas trombocitų agregacinio aktyvumo tyrimams. Trombocitų agregaciniam aktyvumui tirti naudotas veninis kraujas mėgintuvėliuose su K<sub>2</sub>-EDTA. Naudoti antikūnai prieš pasirinktus žymenis, konjuguoti su atitinkamais fluorochromais (žr. Lentelė 2.1). Anti-CD45 skirtas identifikuoti leukocitams, anti-CD14 – monocitams, anti-CD42a – trombocitams.

**2.1 lentelė.** Antikūnai prieš pasirinktus žymenis ir su jais konjuguoti fluorochromai.

<b>Mėgintuvėlis su K<sub>2</sub>-EDTA</b>			
Fluorochromas	FITC	PE	PerCP
Antikūnas	CD45	CD14	CD42a

Citometriniame mėgintuvėlyje 50 μl kraujo su antikoaguliantu etilendiamintetraacto rūgšties dikalio druska (K<sub>2</sub>-EDTA) atsargiai sumaišoma su 5 μl kiekvieno iš monokloninių antikūnų, konjuguotų su fluorochromais: CD45 FITC, CD14 PE, CD42a PerCP. Sumaišius inkubuojama 20 min. Po inkubacijos įpilami 2 ml lizuojančio buferinio tirpalo ir lizuojama 15 min.

Mėginio paruošimas trombocitų sekrecinio aktyvumo tyrimams. Veninis kraujas mėgintuvėliuose su Na citratu naudotas tirti trombocitų sekreciniam aktyvumui. Naudoti antikūnai prieš pasirinktus žymenis, konjuguoti su atitinkamais fluorochromais (žr. Lentelė 2.2). PAC-1 naudotas prieš fibrinogeno prisijungimo vietą, kuri susidaro aktyviuose trombocituose vykstant konformaciniais glikoproteino IIb/IIIa pokyčiams, anti-CD63 ir anti-CD107a skirti įvertinti trombocitų sekrecinį aktyvumą, anti-CD42a skirtas identifikuoti trombocitams, anti-CD61 – trombocitų adhezijos žymuo.

**2.2 lentelė.** Antikūnai prieš pasirinktus žymenis ir su jais konjuguoti fluorochromai.

<b>Mėgintuvėlis su Na citratu</b>					
Fluorochromas	FITC	PE	PerCP	FITC	APC
Antikūnas	PAC-1	CD63	CD42a	CD107a	CD61

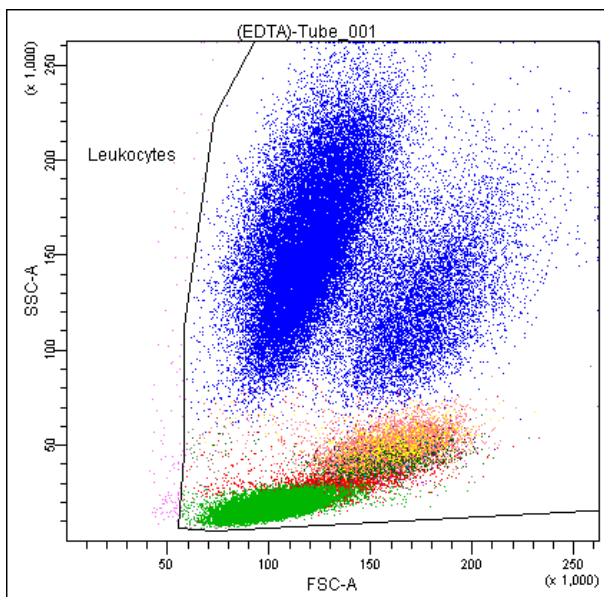
Kraujas su antikoagulantu Na citratu atsargiai sumaišomas ir skiedžiamas su fosfatiniu buferiniu tirpalu (PBS) santykiu 1:10, imama 100 µl kraujo ir 900 µl PBS. Tuomet į citometrinių mėgintuvėlių įpilama 50 µl skiesto kraujo ir po 5 µl kiekvieno iš monokloninių antikūnų, konjuguotų su fluorochromais: CD107a FITC, CD63 PE, CD42a PerCP, CD61 APC. Sumaišoma ir inkubuojama 20 min. Kitame citometriniame mėgintuvėlyje 50 µl skiesto kraujo sumaišoma su 5 µl kiekvieno iš monokloninių antikūnų, konjuguotų su fluorochromais: PAC-1 FITC, CD42a PerCP, CD61 APC. Taip pat inkubuojama 20 min. Po inkubacijos abiejų mėgintuvėlių bandiniai fiksuojami 500 µl fiksuojančio tirpalo. Paruošiami 3 mėgintuvėliai ir analizuojami tēkmės citometru.

Taip pat tirtas trombocitų sekrecinis aktyvumas po stimuliacijos agonistais adenosino difosfatu (ADF) ir trombino receptorių aktyvinančiu peptidu (TRAP). Tam paruošiami dar du mėgintuvėliai:

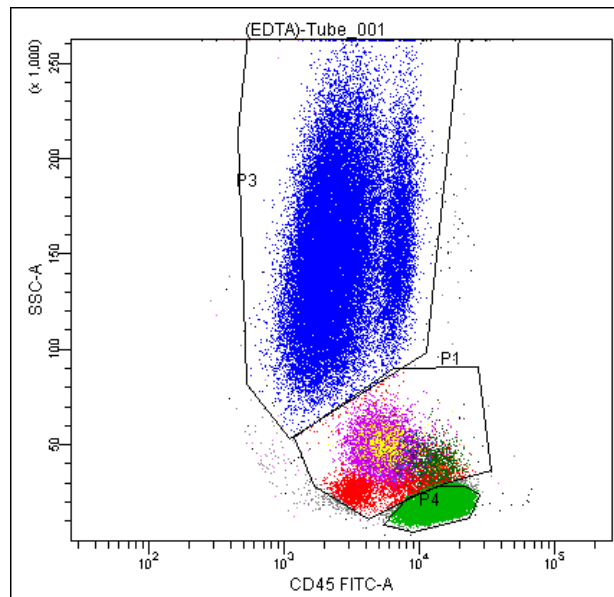
1. Kraujas su antikoagulantu Na citratu atsargiai sumaišomas ir skiedžiamas su fosfatiniu buferiniu tirpalu (PBS) santykiu 1:10, imama 100 µl kraujo ir 900 µl PBS. Tuomet 50 µl skiesto kraujo inkubuojama 15 min. su 5 µl 0,2 mM ADF. Toliau viskas atliekama taip pat kaip ruošiant mėginį su Na citratu.

2. Kraujas su antikoagulantu Na citratu atsargiai sumaišomas ir skiedžiamas su fosfatiniu buferiniu tirpalu (PBS) santykiu 1:10, imama 100 µl kraujo ir 900 µl PBS. Tuomet 50 µl skiesto kraujo inkubuojama 15 min. su 1 µl 1,2 mM TRAP. Toliau viskas atliekama taip pat kaip ruošiant mėginį su Na citratu.

Tiriant trombocitų agregacinį aktyvumą buvo lizuoti eritrocitai. Atlikus visų tirtų pacientų veninio kraujo fenotipinę analizę su tēkmės citometru pagal priekinę (PŠS) ir šoninę (ŠŠS) šviesos skaidas taškinėje diagramoje leukocitai suskirstyto pagal dydį ir vidaus struktūrų sudėtingumą (2.2 pav.).



**2.2 pav.** Taškinė leukocitų diagrama pagal priekinę (x ašyje) ir šoninę (y ašyje) šviesos sklaidas.

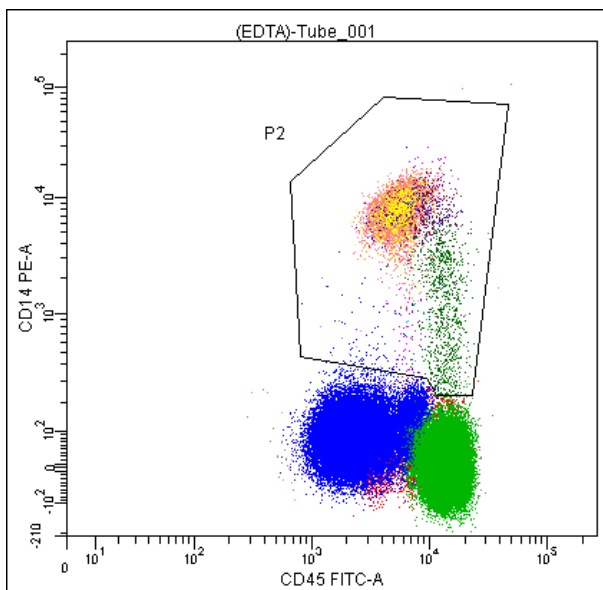


**2.3 pav.** Leukocitų identifikavimas naudojant monokloninį antikūną CD45FITC ir ŠŠS. Apibrėžti monocitų (P1), granulocitų (P3), limfocitų (P4) regionai.

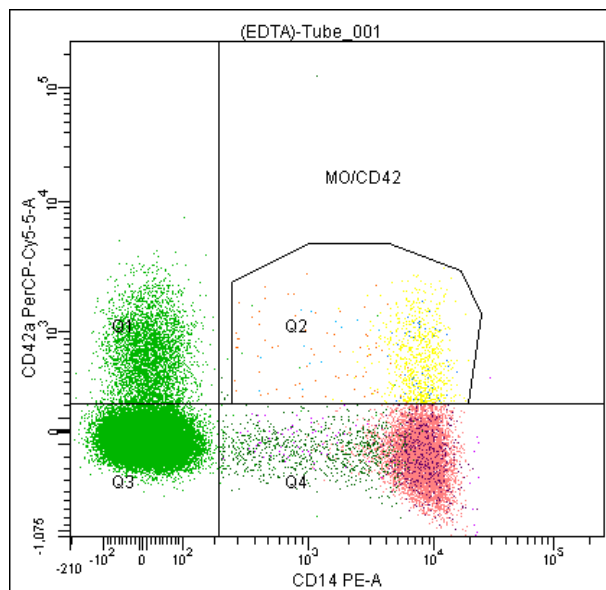
Panaudojus monokloninį antikūną CD45FITC ir ŠŠS taškinėje diagramoje buvo atskirtos tik leukocitų populiacijai priklausančios ląstelės ir apibrėžti regionai: monocitų (P1), granulocitų (P3), limfocitų (P4) (2.3 pav.).

Pagal monokloninių antikūnų CD14PE ir CD45FITC derinį buvo tiksliau atskirti monocitai, kurie apibrėžti regionu (P2) (2.4 pav.).

Derinant CD42aPerCP ir CD14PE taškinėje diagramoje buvo matomi monocitų agregatai su trombocitais Q2 kvadrante, Q1 kvadrante matyti tik trombocitai turintys CD42a žymenį, Q4 kvadrante tik monocitai, pagal CD14 žymenį, o Q3 kvadrante likusios kraujo ląstelės, kurios neturi CD14 ir CD42a žymenų (2.5 pav.).

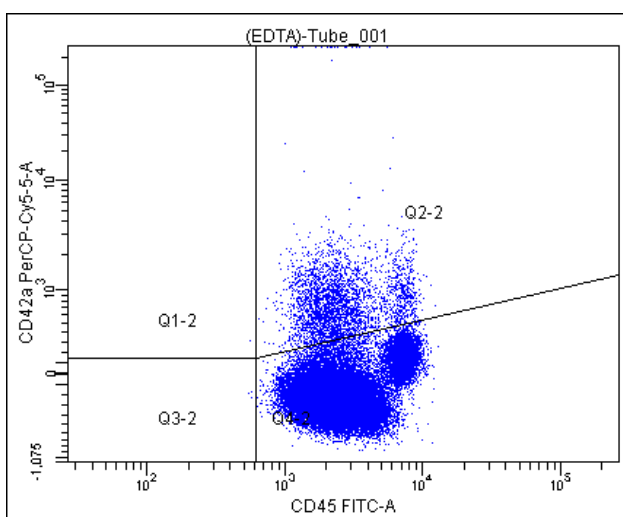


**2.4 pav.** Monocitų identifikavimas naudojant monokloninius antikūnus CD14PE ir CD45FITC ir apibrėžtas jų regionas (P2).

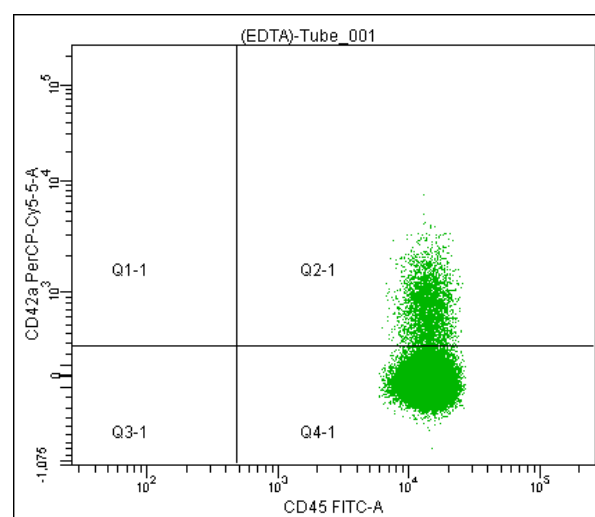


**2.5 pav.** Monocitų – trombocitų agregatai Q2 kvadrante, atskirti naudojant CD42aPerCP ir CD14PE.

Pagal CD42a ir CD45 žymenis buvo atskirti granulocitų – trombocitų (2.6 pav.) ir limfocitų – trombocitų agregatai (2.7 pav.), tiriant tik prieš tai apibrėžtus atitinkamus regionus P3 ir P4. Q2-2 ir Q2-1 kvadrantuose matyti nustatyti atitinkami agregatai, Q4-2 ir Q4-1 kvadrantuose tik leukocitai turintys CD45 žymenį.

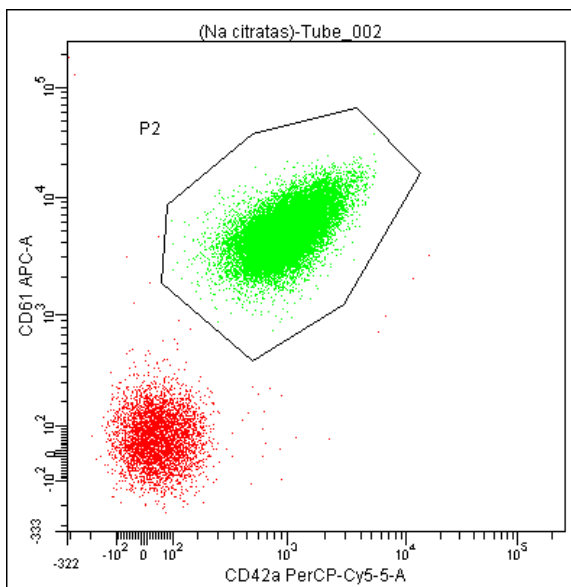


**2.6 pav.** Granulocitų – trombocitų agregatai Q2-2 kvadrante.



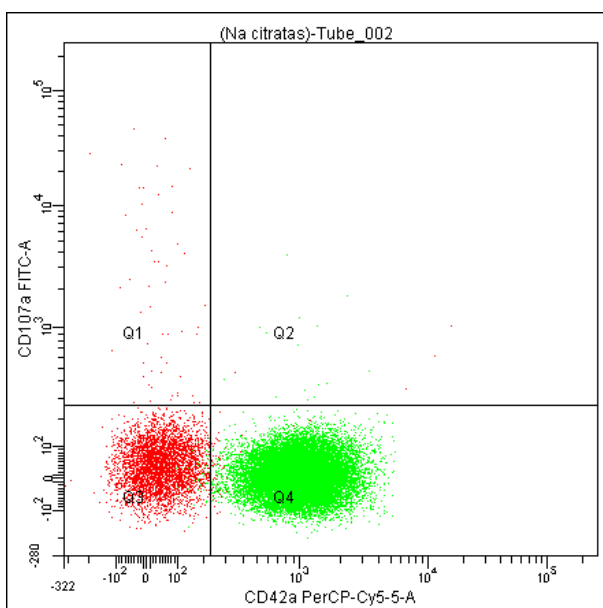
**2.7 pav.** Limfocitų – trombocitų agregatai Q2-1 kvadrante.

Tiriant trombocitų sekrecinį aktyvumą pirmiausia pagal monokloninius antikūnus CD61APC ir CD42aPerCP buvo identifikuoti trombocitai ir apibrėžti regionu (P2), kuris buvo tiriamas toliau (2.8 pav.).

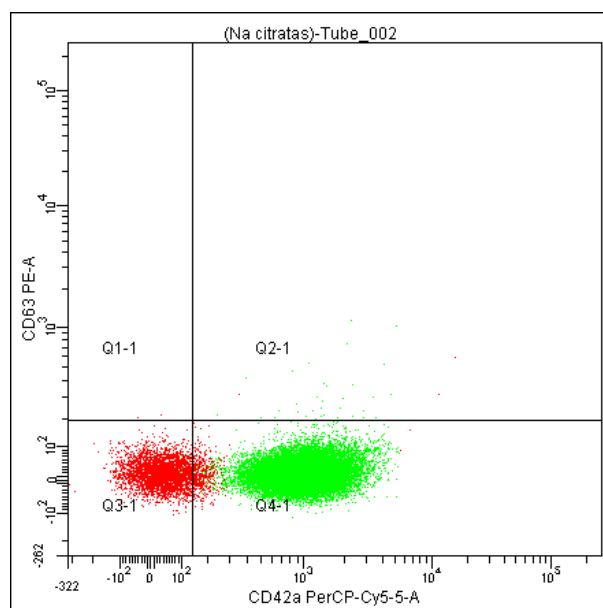


**2.8 pav.** Trombocitų identifikavimas naudojant monokloninius antikūnus CD61APC, CD42aPerCP ir apibrėžtas jų regionas (P2).

Toliau vertintas trombocitų sekrecinis aktyvumas, pagal trombocitų lizosomų ir tankiųjų granulių membraninius baltymus, naudojant CD107aFITC (2.9 pav.) ir CD63PE (2.10 pav.) monokloninius antikūnus prieš juos. Q2 ir Q2-1 kvadrantuose matyti aktyvūs trombocitai atitinkamai su CD107a arba CD63 žymenų raiška.

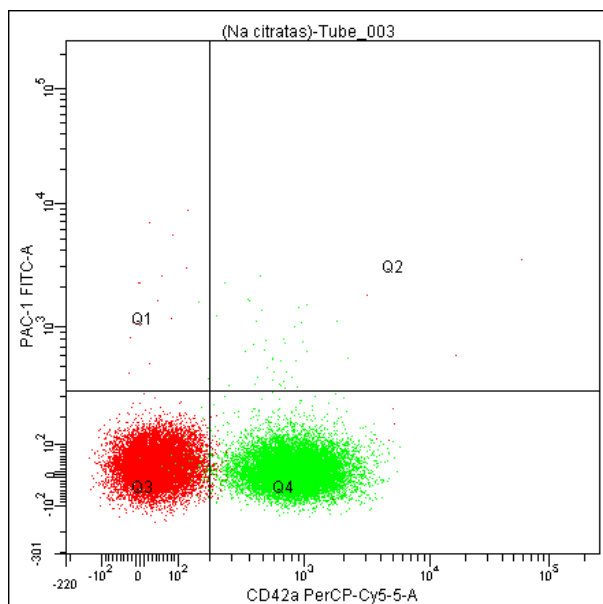


**2.9 pav.** Aktyvūs trombocitai Q2 kvadrante, identifiukuoti naudojant CD107aFITC monokloninį antikūną.



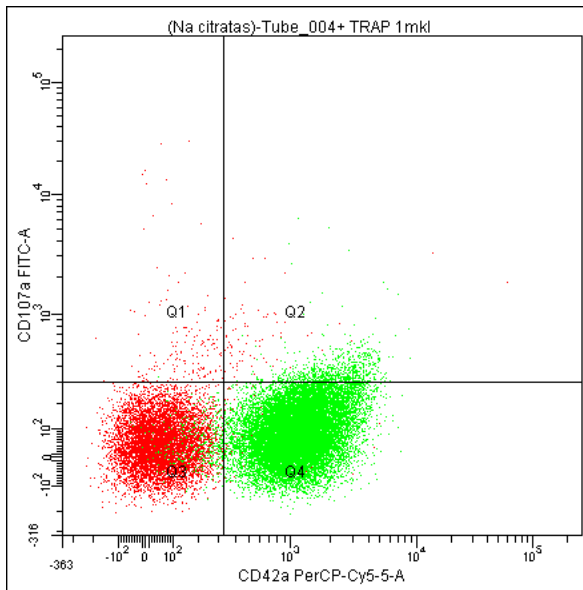
**2.10 pav.** Aktyvūs trombocitai Q2-1 kvadrante, identifiukuoti naudojant CD63PE monokloninį antikūną.

Trombocitų aktyvumas taip pat vertintas PAC-1FITC monokloniniu antikūnu, kuris jungiasi prie fibrinogeno prisijungimo vietos tik aktyviuose trombocituose. 11 paveiksle matyti aktyvūs trombocitai, kuriuose įvykę konformaciniai GPIIb/IIIa pokyčiai.

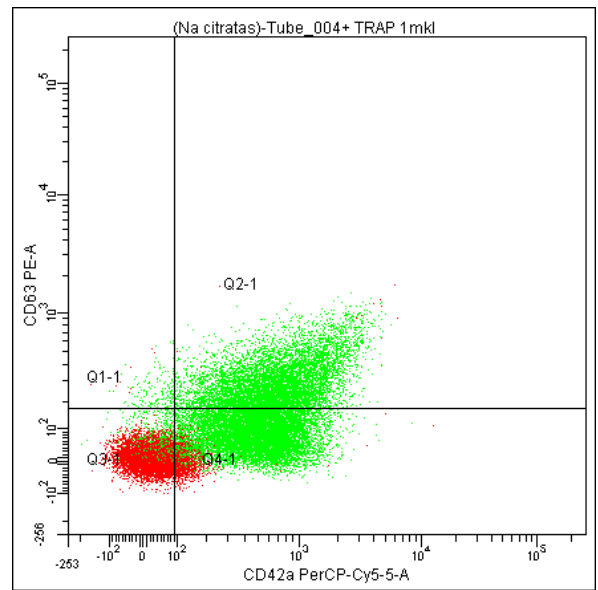


**11 pav.** Aktyvūs trombocitai Q2 kvadrante, identifikuoti naudojant PAC-1 FITC monokloninį antikūną.

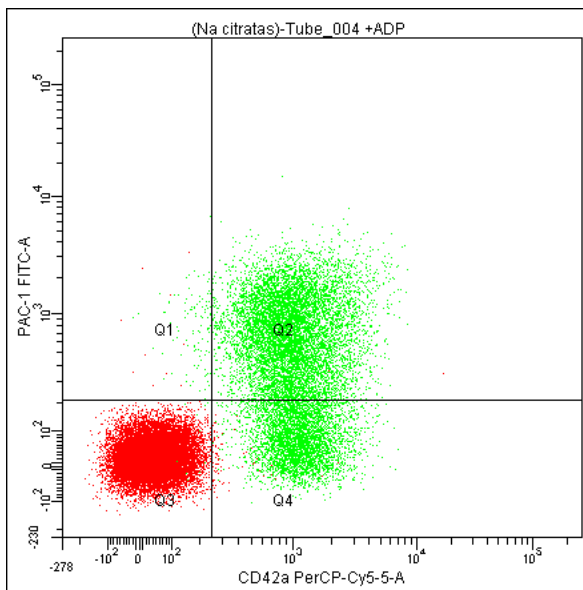
Trombocitų aktyvumas buvo vertinamas ir stimuliuojant agonistais ADF ir TRAP. Aktyvumas nustatytas naudojant tuos pačius monokloninius antikūnus CD107aFITC (2.12 pav.), CD63PE (2.13 pav.) ir PAC-1FITC (2.14 pav.).



**2.12 pav.** Aktyvūs trombocitai po stimuliacijos TRAP, matomi Q2 kvadrante, identifikuoti naudojant CD107aFITC monokloninį antikūną.



**2.13 pav.** Aktyvūs trombocitai po stimuliacijos TRAP, matomi Q2-1 kvadrante, identifikuoti naudojant CD63PE monokloninį antikūną.



**2.14 pav.** Aktyvūs trombocitai po stimuliacijos ADF, matomi Q2 kvadrante, identifikuoti naudojant PAC-1FITC monokloninį antikūną.

Visais atvejais matuota kiek trombocitų savo paviršiuje prisijungę atitinkamus antikūnus prieš tirtus žymenis ir kiek agregatų susidarė. Gauti rezultatai išreikšti procentine išraiška.

## 2.4. Psichosocialinio streso klausimynas

Lėtinio streso įtaka buvo vertinama pagal tiriamųjų užpildyto psichosocialinio streso klausimyno atsakymus. Naudotas LiVicordia projekte parengtas ir validuotas klausimynas [67]. Iš jo remiantis literatūra [1, 2, 43] buvo pasirinktos kelios dalys galimai atspindinčios lėtinio streso poveikį. Pasirinkta nustatyti ar darbo aplinka ir socialinė parama turi įtakos trombocitų aktyvacijai. Darbo aplinka vertinta pagal įtampą darbe. Šis vertinimas apima psichologinius poreikius ir sprendimo priėmimo galimybes. Vertinama taškais 0,2 – 3,3, didesnis balas atspindi didesnę įtampą. Socialinė parama vertinta pagal tris aspektus: socialinę paramą darbe (8 – 32 taškai), emocinę paramą (0 – 6 taškai) ir socialinę integraciją (6 – 36 taškai). Visais aspektais didesnis balas atspindi geresnę socialinę paramą.

Taip pat buvo pasirinkta patikrinti rūkymo ir naktinio darbo poveikį trombocitų aktyvacijai ir nagrinėtiems kraujo rodikliams.

## 2.5. Statistinė duomenų analizė

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant statistinės analizės programą R (R version 3.2.2), GraphPad Prism 6 programą (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA) ir Microsoft Excel 2003 programą. Rezultatai pateikiami vidurkiais su standartiniais nuokrypiais, bei medianomis su pirmuoju kvartiliu (Q1 – 25 procentilis) ir trečiuoju kvartiliu (Q3 – 75 procentilis). Duomenų normalumo tikrinimui buvo pritaikytas *Shapiro-Wilk* testas ( $p > 0,05$ ). Duomenys lyginti taikant dviejų nepriklausomų imčių parametrinę *t testą* ir neparametrinį *Mann-Whitney U* testą. Tiesinės priklausomybės tarp kintamųjų laipsniui įvertinti naudotas *Spearman* koreliacijos koeficientas  $r$ . Koreliacinis ryšys tarp kintamųjų vertintas kaip labai silpnas, kai  $r = 0,00-0,19$ , silpnas, kai  $r = 0,20-0,39$ , vidutinis, kai  $r = 0,40-0,69$ , stiprus, kai  $r = 0,70-0,89$  ir labai stiprus, kai  $r = 0,90-1,00$ . Taip pat atlikta teisinės regresijos analizė. Pasirinktas reikšmingumo lygmuo  $\alpha = 0,05$ , rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .



### 3. REZULTATAI

Buvo ištirti 138 sveiki vyrai (25 – 55 metų amžiaus, vidurkis 38,28 m., standartinis nuokrypis 9,22 m.), iš jų 69 priklausantys jaunų vyrų amžiaus grupei (25 – 39 m.) ir 69 priklausantys vidutinio amžiaus vyrų grupei (40 – 55 m.). Amžiaus vidurkiai tarp šių dviejų grupių pasiskirstė atitinkamai 30,01 m.  $\pm$  3,68 ir 46,54 m.  $\pm$  4,4.

#### 3.1. Tiriamųjų antropometrinių duomenų ir biocheminių rodiklių laboratorinių tyrimų rezultatai

Pirmoje lentelėje pateikiamas visų tiriamųjų antropometrinių duomenų ir biocheminių rodiklių laboratorinių tyrimų rezultatų palyginimas pagal atitinkamas amžiaus grupes. Biocheminių tyrimų rezultatai gauti iš to paties projekto kitose dalyse atliktų tyrimų.

Vertinant tiriamuosius pagal amžiaus grupes, nustatyta, kad statistiškai reikšmingai skyrėsi jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų svoris ( $p = 0,001$ ), KMI ( $p < 0,001$ ), liemens apimtis ( $p < 0,001$ ), diastolinis kraujo spaudimas ( $p = 0,043$ ), bendras cholesterolis ( $p < 0,001$ ), triacilglicerolių koncentracija ( $p = 0,001$ ), mažo tankio lipoproteinų koncentracija ( $p < 0,001$ ) ir C reaktyvus baltymo koncentracija ( $p = 0,011$ ).

Nustatyta, kad 27 jauni ir 28 vidutinio amžiaus vyrai turėjo antsvorį ( $KMI > 25$ ), bei 2 jauni ir 13 vidutinio amžiaus vyrų turėjo nutukimą ( $KMI > 30$ ). Iš jaunų grupės dviem, o iš vidutinio amžiaus dvylikai tiriamųjų nustatytas pilvinis nutukimas, liemens apimtis  $>102$  cm. Didesnis nei 130 mmHg arterinis sistolinis kraujo spaudimas buvo 36 jauniems ir 42 vidutinio amžiaus vyrams, o didesnis nei 80 mmHg diastolinis kraujo spaudimas atitinkamai 31 ir 41 tiriamiesiems.

Pastebėta tai, kad vertinant aterosklerozės rizikos požiūriu jaunesnio amžiaus vyrų grupė turi geresnius rodiklius, būtent mažesnes triacilglicerolių ir MTL cholesterolio koncentracijas, tačiau DTL cholesterolio koncentracija tarp amžiaus grupių panaši.

**3.1 lentelė.** Tiriamųjų antropometrinių duomenų ir biocheminių laboratorinių tyrimų rezultatų palyginimas pagal amžiaus grupes (vertės nurodytos vidurkiais  $\pm$ standartinis nuokrypis (SD) arba medianomis (Q1;Q3 kvartiliai)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Jauni (25 - 39 m.)	Vidutinio amžiaus (40 - 55 m.)	p vertė
Tiriamųjų skaičius	n = 69	n = 69	
Amžius	29 (27; 33) 30,01 $\pm$ 3,68	47 (42; 50) 46,54 $\pm$ 4,4	
Svoris (kg)	81,82 $\pm$ 10,80	88,60 $\pm$ 13,28	0,001
Ūgis (m)	1,84 $\pm$ 0,06	1,82 $\pm$ 0,06	NR
KMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,47 (22,04; 26,10)	26,47 (24,15; 29,03)	<0,001
Liemens apimtis (cm)	84,00 (79,75; 93,00)	94 (87; 100)	<0,001
Sistolinis kraujo spaudimas	131 (124;139)	133 (124; 140)	NR
Diastolinis kraujo spaudimas	79,87 $\pm$ 8,27	83,36 $\pm$ 9,74	0,043
Širdies susitraukimų dažnis	68,48 $\pm$ 11,64	70,28 $\pm$ 12,36	NR
Bendras chol. (mmol/l)	4,61 (4,09; 5,19)	5,24 (4,77; 6,08)	<0,001
TAG (mmol/l)	0,98 (0,74; 1,25)	1,29 (0,93; 1,82)	0,001
DTL (mmol/l)	1,17 (1,03; 1,39)	1,22 (1,08; 1,43)	NR
MTL (mmol/l)	2,93 $\pm$ 0,64	3,43 $\pm$ 0,90	<0,001
CRB (mg/l)	0,52 (0,30; 0,90)	0,80 (0,41; 1,92)	0,011

KMI – kūno masės indeksas, TAG – triacilgliceroliai, DTL – didelio tankio lipoproteinai, MTL – mažo tankio lipoproteinai, CRB – C reaktyvusis baltymas.

### 3.2. Veninio kraujo tyrimo automatizuotu metodu ir tėkmės citometru rezultatai

Atlikto automatizuoto kraujo tyrimo rodiklių rezultatai tiek vertinant visus tiriamuosius kartu, tiek pagal amžiaus grupes atitiko normų ribas (priedas 1). Palyginus pagal amžiaus grupes automatizuoto kraujo tyrimo rezultatus, statistiškai reikšmingai skyrėsi tik limfocitų skaičius ( $p = 0,012$ ) (žr. Lentelė 3.2).

Vertinant trombocitų sekrecinį ir agregacinį aktyvumus tarp amžiaus grupių statistiškai reikšmingo skirtumo nebuvo. Stimuliuojant agonistais statistiškai reikšmingai skyrėsi jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų CD107a žymens sekrecija stimuliuojant TRAP ( $p = 0,008$ ) ir trombocitų aktyvumas nustatomas PAC-1 antikūnais, stimuliuojant ADF ( $p = 0,014$ ) (žr. Lentelė 3.3).

Pastaba. Aprašant ir pateikiant rezultatus lentelėse ir grafikuose naudojami trumpiniai: MPV – vidutinis trombocitų tūris, PDW – trombocitų pasiskirstymas pagal dydį, P-LCR – didelių trombocitų skaičiaus santykis su bendru trombocitų skaičiumi, PCT – trombocritas. Agregatai: MO/CD42a – monocitų – trombocitų, GRA/CD42a – granulocitų – trombocitų,

LY/CD42a – limfocitų – trombocitų. TRAP - trombino receptorius aktyvinantis baltymas, ADF – adenozino difosfatas.

**3.2 lentelė.** Tiriamųjų automatizuoto kraujo tyrimo rezultatų palyginimas pagal amžiaus grupes (vertės nurodytos medianomis (Q1;Q3 kvartiliai)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Jauni (25 - 39 m.)	Vidutinio amžiaus (40 - 55 m.)	p vertė
Tiriamųjų skaičius	n = 69	n = 69	
Leukocitai, $\times 10^9/l$	5,77 (4,90; 6,83)	5,62 (4,52; 6,58)	NR
Neutrofilai, $\times 10^9/l$	2,65 (2,17; 3,34)	2,64 (2,11; 3,41)	NR
Limfocitai, $\times 10^9/l$	2,34 (1,92; 2,80)	2,09 (1,62; 2,45)	0,012
Monocitai, $\times 10^9/l$	0,53 (0,43; 0,63)	0,48 (0,38; 0,61)	NR
Eozinofilai, $\times 10^9/l$	0,16 (0,11; 0,24)	0,16 (0,11; 0,26)	NR
Bazofilai, $\times 10^9/l$	0,03 (0,02; 0,04)	0,03 (0,01; 0,04)	NR
Trombocitai, $\times 10^9/l$	210 (182; 232)	208 (176; 241)	NR
MPV, fl	10,30 (9,75; 10,80)	10,3 (9,9; 10,9)	NR
PDW, fl	11,90 (11,00; 12,85)	11,90 (11,05; 13,00)	NR
P-LCR, %	27,0 (23,0; 31,7)	28,30 (23,35; 32,15)	NR
PCT, %	0,21 (0,19; 0,23)	0,22 (0,18; 0,25)	NR

**3.3 lentelė.** Trombocitų funkcinio aktyvumo rezultatų palyginimas tarp amžiaus grupių (vertės nurodytos medianomis (Q1;Q3 kvartiliai)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Jauni (25 - 39 m.)	Vidutinio amžiaus (40 - 55 m.)	p vertė
Tiriamųjų skaičius	n = 69	n = 69	
MO/CD42a, %	9,00 (7,80; 10,45)	9,00 (7,50; 10,65)	NR
GRA/CD42a, %	9,30 (8,05; 10,40)	8,80 (6,70; 10,25)	NR
LY/CD42a, %	9,6 (8,2; 10,7)	9,70 (7,85; 10,75)	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0,1; 0,3)	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,2 (0,1; 0,3)	0,2 (0,1; 0,2)	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2 (0,1; 0,4)	0,2 (0,1; 0,3)	NR
CD63 su TRAP, %	34,40 (22,75; 44,35)	34,1 (22,6; 43,6)	NR
CD107a su TRAP, %	0,80 (0,45; 1,25)	0,5 (0,3; 1,0)	0,008
PAC-1 su ADF, %	57,80 (48,50; 77,05)	53,30 (41,15; 64,75)	0,014

### 3.3. Rūkymo ir naktinio darbo įtakos rezultatai

Tiriant rūkymo ir naktinio darbo įtaką trombocitų aktyvacijai ir kraujo rodikliams, visi tiriamieji buvo tirti neskirstant į amžiaus grupes. Vyrai suskirstyti į rūkančius (n = 27) ir

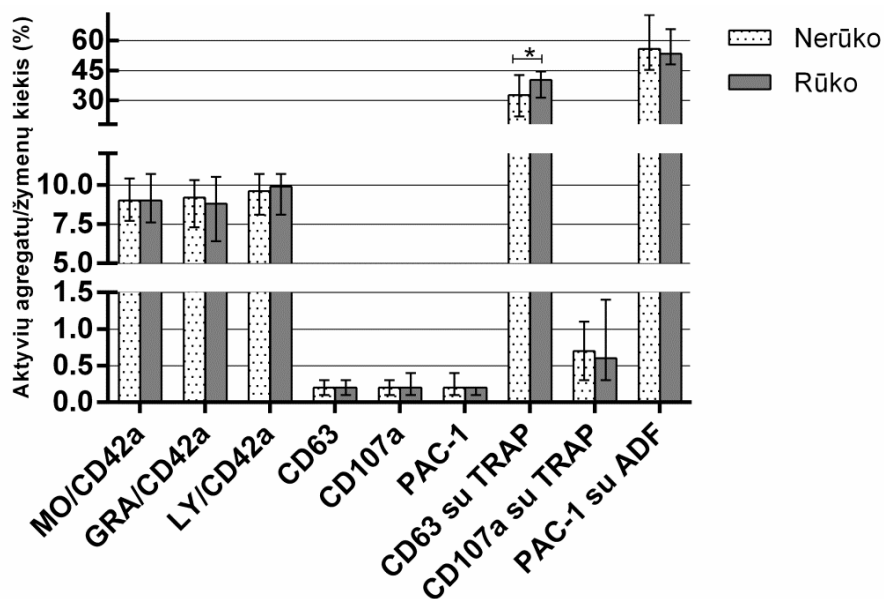
nerūkančius (n = 111) ir atitinkamai į dirbančius naktinį darbą (n = 12) ir nedirbančius naktinio darbo (n = 126).

Nustatyta, kad rūkymas neturi statistiškai reikšmingos įtakos trombocitų aktyvacijos žymenims, bei agregatams, tačiau tarp rūkančių ir nerūkančių asmenų statistiškai reikšmingai skyrėsi CD63 žymens raiška stimuliuojant TRAP agonistu (p = 0,028) (žr. Lentelė 3.4). Gautų rezultatų palyginimas pateikiamas grafiškai pirmame ir antrame paveiksluose.

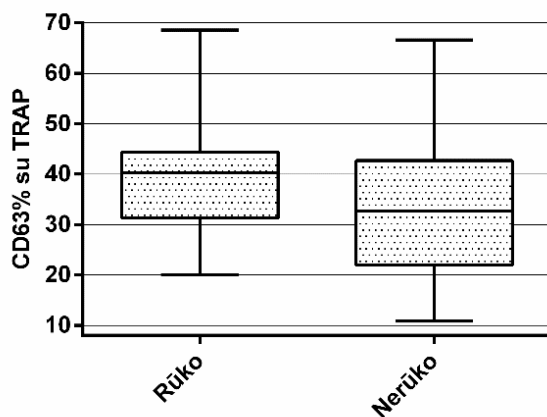
Pastaba. Duomenys pavaizduoti stulpelinėmis diagramomis pagal medianas su Q1 ir Q3 kvartiliais, remiantis pagal kitų autorių straipsniuose pateikiamus trombocitų žymenų grafinius vaizdavimus [68, 69]. Statistiškai reikšmingi duomenys pavaizduoti stačiakampėmis (angl. *boxplot*) tipo diagramomis.

**3.4 lentelė.** Rūkančiųjų ir nerūkančiųjų grupių įverčių palyginimas (vertės nurodytos medianomis ir Q1; Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Rūko		Nerūko		p vertė
Tiriamųjų skaičius	n = 27		n = 111		
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	9,0	7,6; 10,7	9,0	7,7; 10,4	NR
GRA/CD42a, %	8,8	6,4; 10,5	9,2	7,3; 10,3	NR
LY/CD42a, %	9,9	8,1; 10,7	9,6	8,1; 10,7	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,2	0,1; 0,4	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2	0,1; 0,2	0,2	0,1; 0,4	NR
CD63 su TRAP, %	40,2	31,3; 44,4	32,6	22,0; 42,7	0,028
CD107a su TRAP, %	0,6	0,3; 1,4	0,7	0,3; 1,1	NR
PAC-1 su ADF, %	53,3	48,0; 65,7	55,7	45,3; 72,8	NR



**3.1 pav.** Rūkymo įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įvėrčių palyginimas. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje vaizduojamas aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius, (\* $p < 0,05$ ).

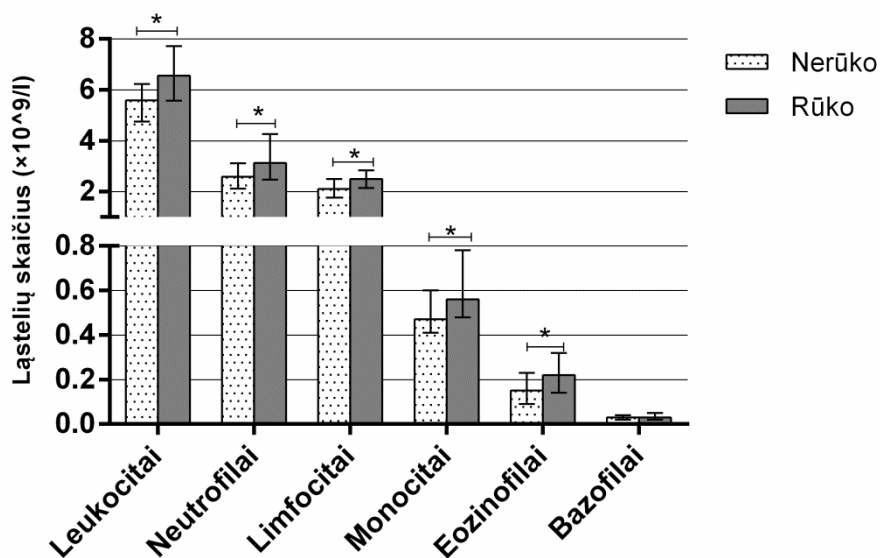


**3.2 pav.** Rūkymo įtaka CD63 stimuliavus TRAP agonistu.

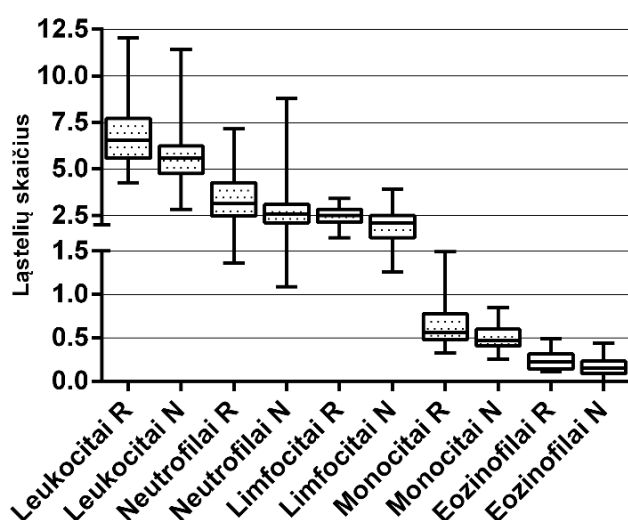
Vertinant rūkymo įtaką kraujo rodikliams, nustatyta, kad statistiškai reikšmingai skyrėsi rūkančių ir nerūkančių vyrų leukocitų ( $p = 0,002$ ), neutrofilų ( $p = 0,010$ ), limfocitų ( $p = 0,008$ ), monocitų ( $p = 0,004$ ), eozinofilų ( $p = 0,003$ ) ląstelių kiekis. Kitų rodiklių skirtumai buvo statistiškai nereikšmingi. Bazofilų skaičiaus vidurkis artimas reikšmingumo kriterijui ( $p = 0,086$ ) (žr. Lentelė 3.5). Trečiame ir ketvirtame paveiksluose matyti statistiškai reikšmingai besiskiriančių kraujo rodiklių palyginimas rūkymo įtakoje.

**3.5 lentelė.** Rūkančiųjų ir nerūkančiųjų grupių įverčių palyginimas (vertės nurodytos medianomis ir Q1; Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Rūko		Nerūko		p vertė
Tiriamųjų skaičius	n = 27		n = 111		
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
Leukocitai, $\times 10^9/l$	6,55	5,57; 7,71	5,58	4,75; 6,23	0,002
Neutrofilai, $\times 10^9/l$	3,12	2,47; 4,26	2,58	2,11; 3,11	0,010
Limfocitai, $\times 10^9/l$	2,49	2,14; 2,83	2,10	1,76; 2,49	0,008
Monocitai, $\times 10^9/l$	0,56	0,48; 0,78	0,47	0,41; 0,60	0,004
Eozinofilai, $\times 10^9/l$	0,22	0,14; 0,32	0,15	0,09; 0,23	0,003
Bazofilai, $\times 10^9/l$	0,03	0,02; 0,05	0,03	0,02; 0,04	0,086
Trombocitai, $\times 10^9/l$	209	182; 245	208	181; 237	NR
MPV, fl	10,5	10,0; 11,1	10,3	9,8; 10,8	NR
PDW, fl	12,2	11,5; 13,6	11,8	10,9; 12,9	NR
P-LCR, %	29,0	25,0; 34,8	26,9	22,7; 31,8	NR
PCT, %	0,22	0,19; 0,27	0,21	0,19; 0,24	NR



**3.3 pav.** Rūkančių ir nerūkančių vyrų kraujo ląstelių medianų palyginimas. X ašyje pavaizduoti kraujo rodikliai, Y ašyje ląstelių skaičius  $\times 10^9/l$ . Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius, ( $*p < 0,05$ ).

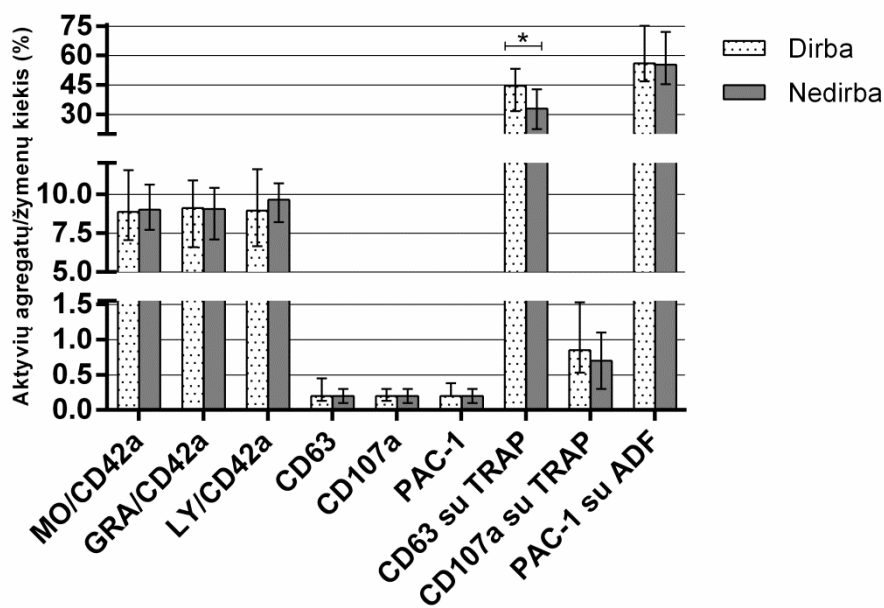


3.4 pav. Rūkymo įtaka leukocitams ir jų populiacijoms. R – rūko, N – nerūko.

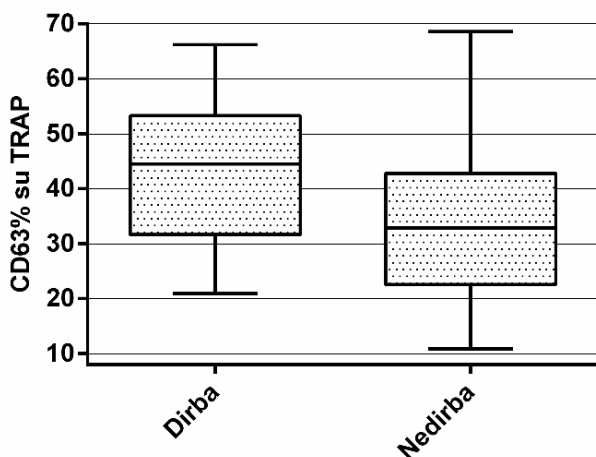
Nustatyta, kad naktinis darbas taip pat kaip ir rūkymas statistiškai reikšmingą įtaką turi tik CD63 žymens raiškai stimuliuojant TRAP agonistu ( $p = 0,036$ ) (žr. Lentelė 3.4). Gautų rezultatų palyginimas pateikiamas grafiškai penktame ir šeštame paveiksluose.

3.6 lentelė. Dirbančiųjų naktinį darbą ir nedirbančiųjų grupių įverčių palyginimas (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Dirba		Nedirba		p vertė
	n = 12		n = 126		
Tiriamųjų skaičius	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	8,85	7,05; 11,53	9,0	7,7; 10,6	NR
GRA/CD42a, %	9,10	6,60; 10,88	9,05	7,10; 10,40	NR
LY/CD42a, %	8,95	6,65; 11,6	9,65	8,20; 10,70	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,20	0,13; 0,45	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,20	0,13; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,20	0,20; 0,38	0,2	0,1; 0,3	NR
CD63 su TRAP, %	44,50	31,63; 53,30	32,9	22,53; 42,78	0,036
CD107a su TRAP, %	0,85	0,53; 1,53	0,7	0,3; 1,1	NR
PAC-1 su ADF, %	55,95	46,83; 75,08	55,30	45,45; 71,98	NR



**3.5 pav.** Naktinio darbo įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įvertių palyginimas. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje vaizduojamas aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius, (\* $p < 0,05$ ).



**3.6 pav.** Naktinio darbo įtakos CD63 stimuliavus TRAP agonistu.

Vertinant naktinio darbo įtaką kraujo rodikliams, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp dirbančių naktį ir nedirbančių nenustatyta (žr. Lentelė 3.7).



**3.7 lentelė.** Dirbančiųjų naktinį darbą ir nedirbančiųjų grupių įverčių palyginimas (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Dirba		Nedirba		p vertė
	n = 12		n = 126		
Tiriamųjų skaičius	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
Leukocitai, $\times 10^9/l$	6,42	5,22; 7,63	5,67	4,77; 6,53	NR
Neutrofilai, $\times 10^9/l$	2,90	2,49; 4,06	2,63	2,16; 3,29	NR
Limfocitai, $\times 10^9/l$	2,17	1,93; 2,93	2,19	1,79; 2,54	NR
Monocitai, $\times 10^9/l$	0,58	0,40; 0,66	0,50	0,41; 0,61	NR
Eozinofilai, $\times 10^9/l$	0,21	0,16; 0,23	0,16	0,10; 0,24	NR
Bazofilai, $\times 10^9/l$	0,02	0,01; 0,03	0,03	0,02; 0,04	NR
Trombocitai, $\times 10^9/l$	213,5	150,5; 232,0	208,5	182,0; 239,3	NR
MPV, fl	10,65	9,48; 11,05	10,30	9,80; 10,83	NR
PDW, fl	12,50	10,83; 13,23	11,85	11,10; 12,90	NR
P-LCR, %	30,15	21,60; 32,48	27,00	23,35; 31,83	NR
PCT, %	0,21	0,17; 0,25	0,22	0,19; 0,24	NR

#### 3.4. Psichosocialinio streso klausimyno atsakymų rezultatai

Psichosocialinio įvertinimo klausimyno apibendrinti rezultatai pagal amžiaus grupes pateikti 3.8 ir 3.9 lentelėse. Pagal rezultatus matyti, kad jaunų vyrų grupė patiria šiek tiek didesnę įtampą darbe nei vidutinio amžiaus vyrai. Socialinę paramą darbe abi amžiaus grupės jaučia vienodą, o emocinę paramą šiek tiek didesnę jaučia jaunesni. Taip pat jaunesnių vyrų geresnė socialinė integracija. Pagal klausimyno vertinimo taškų skalių intervalus ir grupių vidurkius matyti, kad visi tiriamieji jaučiu nedidelę įtampą darbe, didesnę nei vidutinę socialinę paramą darbe ir emocinę paramą, bet socialinė integracija šiek tiek mažesnė už vidutinę.

**3.8 lentelė.** Psichosocialinio klausimyno rezultatai sveikų jaunų (25 – 39 m.) vyrų amžiaus grupėje (vertės nurodytos medianomis, vidurkiais ir standartiniais nuokrypiais ( $\pm$ SD)).

	Taškų skalės intervalai	Mediana	Vidurkis	$\pm$ SD
<b>Darbo aplinka</b>				
Įtampa darbe	0,2 - 3,3	0,71	0,72	0,17
<b>Socialinė parama</b>				
Socialinė parama darbe	8 - 32	24	24,12	3,80
Emocinė parama	0 - 6	4	4,07	1,12
Socialinė integracija	6 - 36	20	20,13	5,22

**3.9 lentelė.** Psichosocialinio klausimyno rezultatai sveikų vidutinio amžiaus (25 – 39 m.) vyrų grupėje (vertės nurodytos medianomis, vidurkais ir standartiniais nuokrypiais ( $\pm$ SD)).

	Taškų skalės intervalai	Mediana	Vidurkis	$\pm$ SD
<b>Darbo aplinka</b>				
Įtampa darbe	0,2 - 3,3	0,64	0,66	0,15
<b>Socialinė parama</b>				
Socialinė parama darbe	8 - 32	24	24,12	3,59
Emocinė parama	0 - 6	4	3,93	1,12
Socialinė integracija	6 - 36	19	19,55	5,67

### 3.5. Psichosocialinio streso įtakos trombocitų aktyvacijai rezultatai

Vertinant streso įtaką trombocitų agregaciniam ir sekretiniam aktyvumui, jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų atsakymų rezultatai buvo vertinami atskirai. Kiekvienos vertintos dalies atveju tiriamieji buvo padalinti į dvi grupes pagal tos dalies atsakymų rezultatų medianas: tiriamieji, surinkę taškus iki medianos ir tiriamieji, surinkę taškus virš medianos. Vertinta procentinė agregatų, aktyvacijos žymenų be stimuliacijos ir stimuliavus agonistais išraiška.

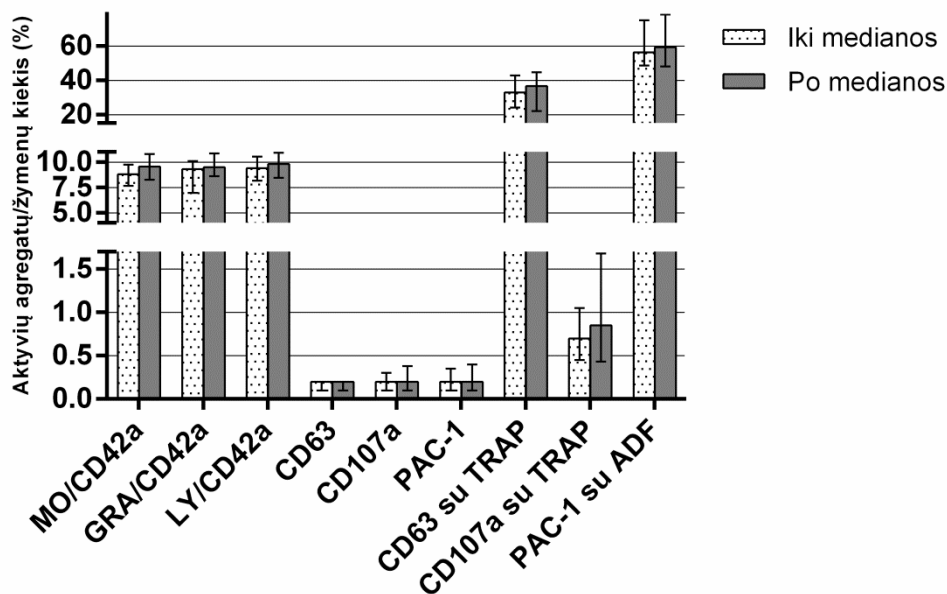
Nustatyta, kad įtampa darbe statistiškai reikšmingos įtakos neturi nei jauniems, nei vyresnio amžiaus vyrams (žr. Lentelė 3.10 ir 3.11). Pastebėta, kad vyresniems PAC-1 daugiau yra, kai įtampa mažesnė, o jaunesniems, kai įtampa didesnė. Taip pat CD107a vyresniems vyrams nustatyta daugiau esant mažesnei įtampai. Gautų rezultatų palyginimas pateikiamas grafiškai septintame ir aštuntame paveiksluose.

**3.10 lentelė.** Įtampos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

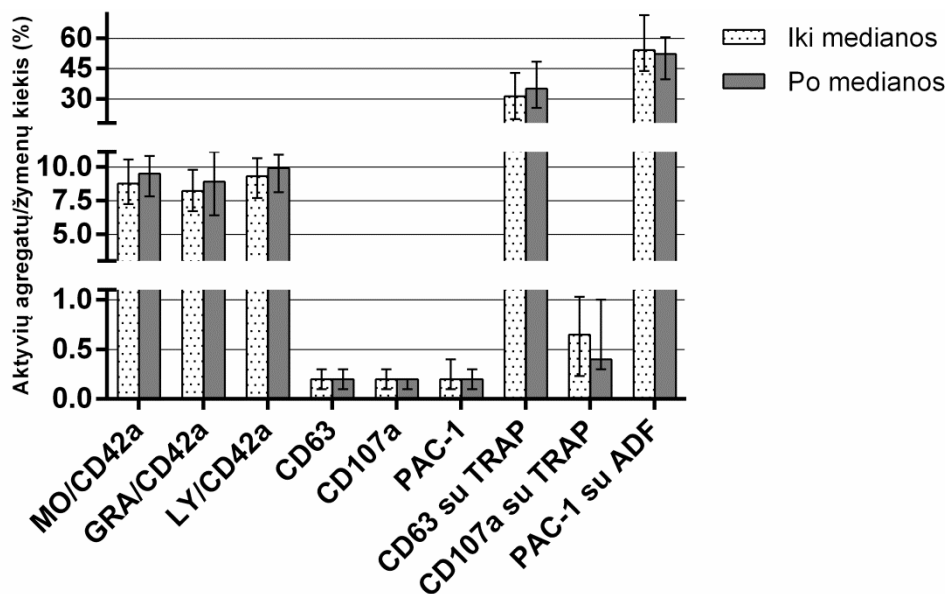
Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
Tiriamųjų skaičius	n = 33		n = 36		
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	8,80	7,65; 9,75	9,55	8,25; 10,80	NR
GRA/CD42a, %	9,30	6,95; 10,10	9,50	8,60; 10,85	NR
LY/CD42a, %	9,40	8,15; 10,55	9,80	8,45; 10,93	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,2	0,1; 0,2	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,2	0,1; 0,3	0,20	0,10; 0,38	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,20	0,10; 0,35	0,2	0,1; 0,4	NR
CD63 su TRAP, %	32,90	24,00; 42,65	36,55	22,08; 44,63	NR
CD107a su TRAP, %	0,70	0,45; 1,05	0,85	0,43; 1,68	NR
PAC-1 su ADF, %	56,20	48,50; 74,95	59,10	48,03; 78,28	NR

**3.11 lentelė.** Įtampos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	n = 34		n = 35		
Tiriamųjų skaičius	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	8,75	7,23; 10,55	9,5	7,8; 10,8	NR
GRA/CD42a, %	8,20	6,70; 9,78	8,9	6,4; 11,1	NR
LY/CD42a, %	9,30	7,68; 10,63	9,9	8,1; 10,9	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2	0,1; 0,4	0,2	0,1; 0,3	NR
CD63 su TRAP, %	31,30	19,98; 42,78	35,1	25,5; 48,4	NR
CD107a su TRAP, %	0,65	0,23; 1,03	0,4	0,3; 1,0	NR
PAC-1 su ADF, %	54,20	43,83; 71,4	52,3	39,7; 60,5	NR



**3.7 pav.** Įtampos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje vaizduojamas aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.



**3.8 pav.** Įtampos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje vaizduojamas aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.

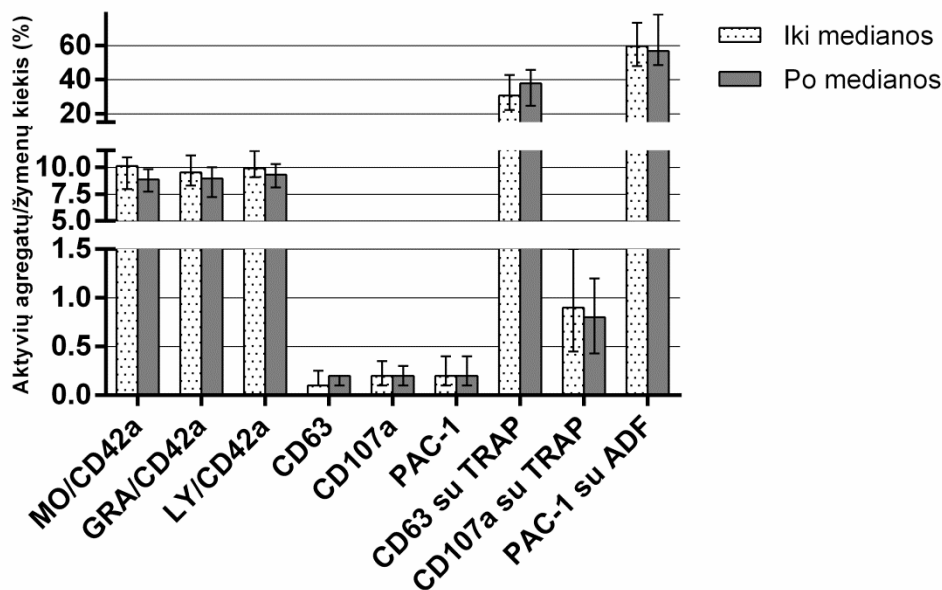
Nustatyta, kad socialinė parama darbe statistiškai reikšmingos įtakos neturi nei jauniems, nei vyresnio amžiaus vyrams (žr. Lentelė 3.12 ir 3.13). Pastebėta, kad vyresniems vyrams CD63, CD107a ir PAC-1, o jaunesniems tik CD63 daugiau yra, kai socialinė parama darbe didesnė. Taip pat stimuliuojant agonistais jauniems vyrams CD63, o vyresniems CD63 ir PAC-1 nustatyta daugiau esant didesnei socialinei paramai darbe. Gautų rezultatų palyginimas pateikiamas grafiškai 3.9 ir 3.10 paveiksluose.

**3.12 lentelė.** Socialinės paramos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

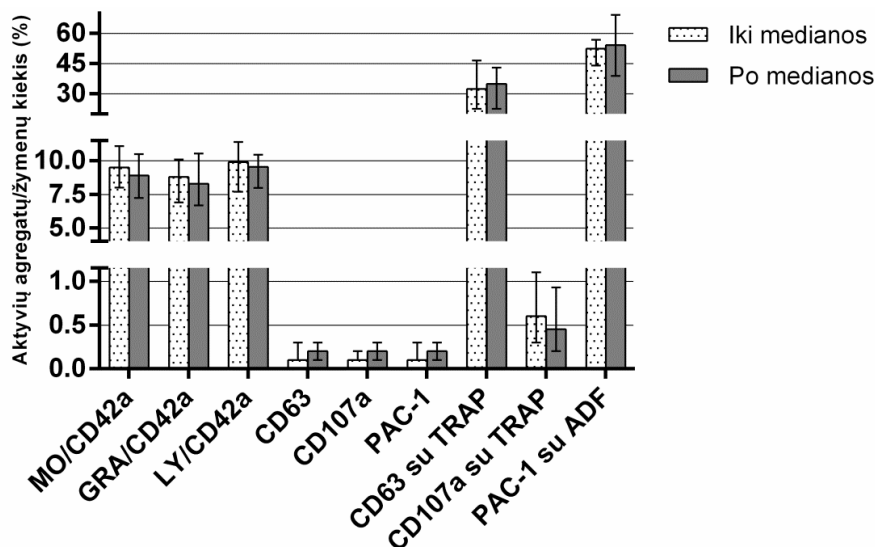
Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	n = 29		n = 40		
Tiriamųjų skaičius	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	10,10	7,95; 10,90	8,85	7,73; 9,80	NR
GRA/CD42a, %	9,50	8,30; 11,10	8,95	7,23; 10,00	NR
LY/CD42a, %	9,90	9,05; 11,50	9,30	8,10; 10,28	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,10	0,10; 0,25	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,20	0,10; 0,35	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2	0,1; 0,4	0,2	0,1; 0,4	NR
CD63 su TRAP, %	30,60	22,15; 42,75	37,85	24,70; 45,75	NR
CD107a su TRAP, %	0,90	0,45; 1,50	0,80	0,43; 1,20	NR
PAC-1 su ADF, %	59,60	48,05; 73,40	56,75	48,50; 78,30	NR

**3.13 lentelė.** Socialinės paramos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	n = 27		n = 42		
Tiriamųjų skaičius	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	9,5	8,0; 11,1	8,90	7,23; 10,50	NR
GRA/CD42a, %	8,8	6,9; 10,1	8,30	6,68; 10,53	NR
LY/CD42a, %	9,9	7,7; 11,4	9,55	7,98; 10,45	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,1	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,1	0,1; 0,2	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,1	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD63 su TRAP, %	32,4	22,5; 46,5	34,90	22,53; 43,08	NR
CD107a su TRAP, %	0,6	0,3; 1,1	0,45	0,20; 0,93	NR
PAC-1 su ADF, %	52,4	44,1; 56,9	54,20	38,95; 69,15	NR



**3.9 pav.** Socialinės paramos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.



**3.10 pav.** Socialinės paramos darbe įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.

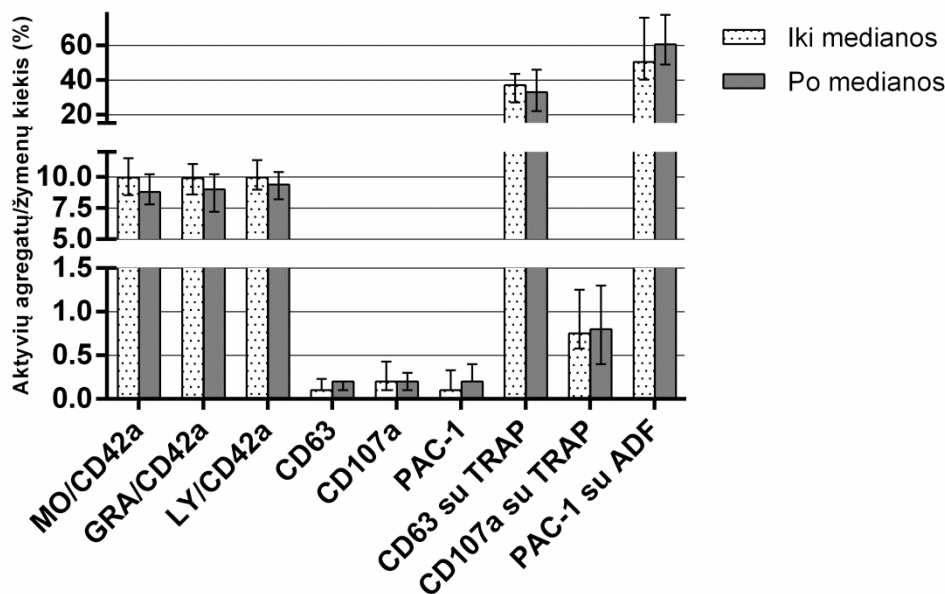
Vertinant emocinės paramos įtaką jaunų vyrų grupėje statistiškai reikšmingo skirtumo nenustatyta. Arti reikšmingumo ribos buvo monocitų – trombocitų ( $p = 0,059$ ) ir granulocitų – trombocitų ( $p = 0,081$ ) agregatų skaičiaus skirtumas (žr. Lentelė 3.14). Vidutinio amžiaus grupėje statistiškai reikšmingų skirtumų taip pat nenustatyta (žr. Lentelė 3.15). Pastebėta, kad geresnės emocinės paramos atveju pas jaunus daugiau yra CD63 ir PAC-1, bei CD107a su TRAP, PAC-1 su ADF, o pas vyresnius CD63 ir CD63 su TRAP. Gautų rezultatų palyginimas pateikiamas grafiškai 3.11 ir 3.12 paveiksluose.

**3.14 lentelė.** Emocinės paramos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

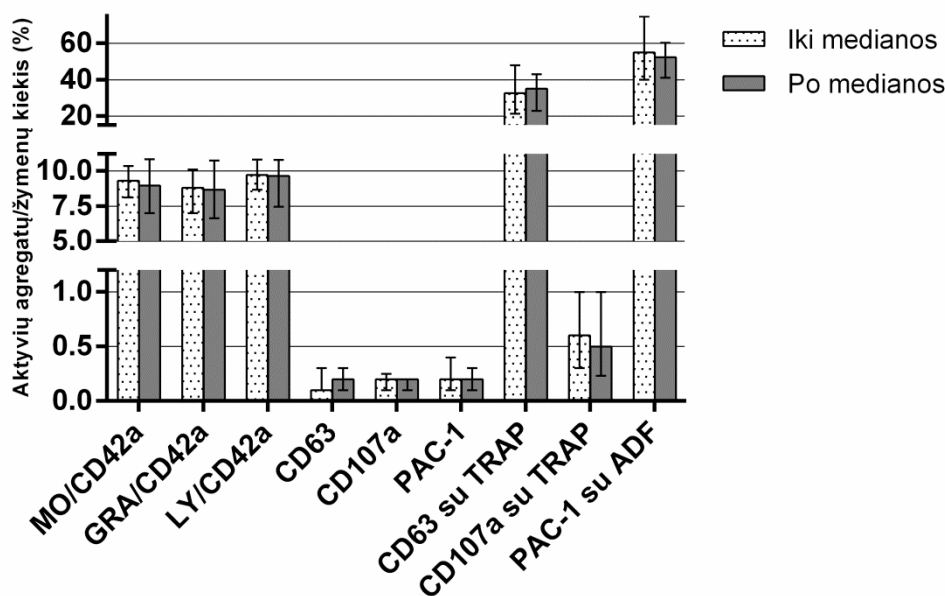
Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
Tiriamųjų skaičius	n = 18		n = 51		
MO/CD42a, %	9,95	8,53; 11,50	8,8	7,8; 10,2	0,059
GRA/CD42a, %	9,9	8,6; 11,03	9,0	7,2; 10,2	0,081
LY/CD42a, %	9,95	8,98; 11,35	9,4	8,2; 10,4	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,10	0,10; 0,23	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,20	0,10; 0,43	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,10	0,10; 0,33	0,2	0,2; 0,4	NR
CD63 su TRAP, %	37,00	26,98; 43,48	32,9	22; 45,8	NR
CD107a su TRAP, %	0,75	0,58; 1,25	0,8	0,4; 1,3	NR
PAC-1 su ADF, %	50,30	40,15; 75,80	60,4	48,9; 77,6	NR

**3.15 lentelė.** Emocinės paramos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	n = 17		n = 52		
Tiriamųjų skaičius	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	9,30	8,10; 10,35	8,95	7,00; 10,83	NR
GRA/CD42a, %	8,8	7,0; 10,1	8,65	6,63; 10,73	NR
LY/CD42a, %	9,70	8,65; 10,80	9,65	7,45; 10,78	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,1	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,20	0,10; 0,25	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2	0,1; 0,4	0,2	0,1; 0,3	NR
CD63 su TRAP, %	32,60	21,25; 47,85	35,10	22,88; 42,93	NR
CD107a su TRAP, %	0,6	0,3; 1,0	0,5	0,23; 1,0	NR
PAC-1 su ADF, %	550	40,0; 74,8	52,35	41,03; 60,20	NR



**3.11 pav.** Emocinės paramos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.



**3.12 pav.** Emocinės paramos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.

Vertinant socialinę integraciją statistiškai reikšmingas skirtumas nenustatytas nei jaunesniems, nei vyresniems vyrams (žr. Lentelė 3.16 ir 3.17). Pastebėta, kad pas vyresnius vyrus geresnės integracijos atveju nustatyta daugiau agregatų. Gautų rezultatų palyginimas pateikiamas grafiškai 3.13 ir 3.14 paveiksluose.

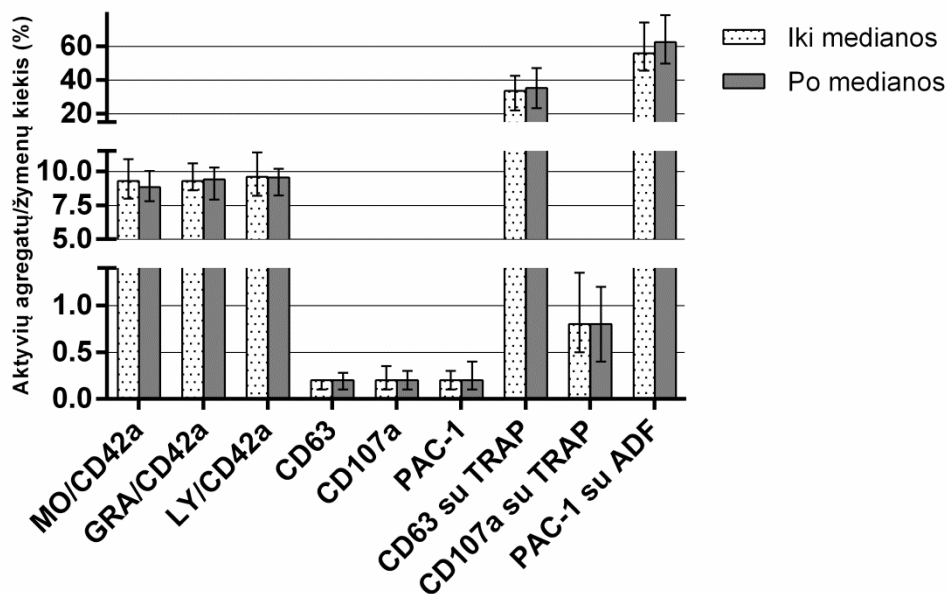
**3.16 lentelė.** Socialinės integracijos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
Tiriamųjų skaičius	n = 33		n = 36		
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
MO/CD42a, %	9,3	8,0; 10,9	8,85	7,80; 10,03	NR
GRA/CD42a, %	9,3	8,6; 10,6	9,40	7,93; 10,28	NR
LY/CD42a, %	9,6	8,2; 11,4	9,55	8,23; 10,20	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,2	0,1; 0,2	0,20	0,10; 0,28	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,20	0,10; 0,35	0,2	0,1; 0,3	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,4	NR
CD63 su TRAP, %	33,6	22,0; 42,4	35,20	23,28; 46,93	NR
CD107a su TRAP, %	0,80	0,50; 1,35	0,8	0,4; 1,2	NR
PAC-1 su ADF, %	55,70	45,55; 74,05	62,45	49,70; 78,30	NR

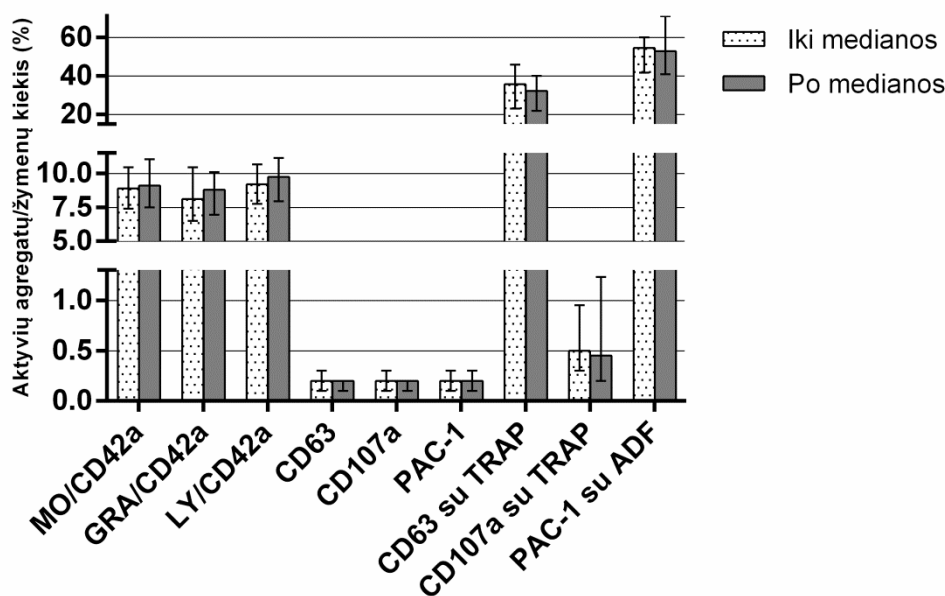


**3.17 lentelė.** Socialinės integracijos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje (vertės nurodytos medianomis ir Q1;Q3 kvartiliais (25 procentilis; 75 procentilis)). NR – nereikšminga.

Kintamoji	Iki medianos		Po medianos		p vertė
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	
Tiriamųjų skaičius	n = 33		n = 36		
MO/CD42a, %	8,90	7,40; 10,45	9,10	7,50; 11,03	NR
GRA/CD42a, %	8,10	6,50; 10,45	8,80	6,95; 10,10	NR
LY/CD42a, %	9,20	7,75; 10,65	9,75	7,95; 11,13	NR
CD42a/CD61/CD63, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/CD107a, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,2	NR
CD42a/CD61/PAC-1, %	0,2	0,1; 0,3	0,2	0,1; 0,3	NR
CD63 su TRAP, %	35,70	23,05; 45,85	32,15	21,85; 40,08	NR
CD107a su TRAP, %	0,50	0,30; 0,95	0,45	0,20; 1,23	NR
PAC-1 su ADF, %	54,4	41,7; 59,9	52,85	40,90; 70,88	NR



**3.13 pav.** Socialinės integracijos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų jaunų vyrų amžiaus grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.

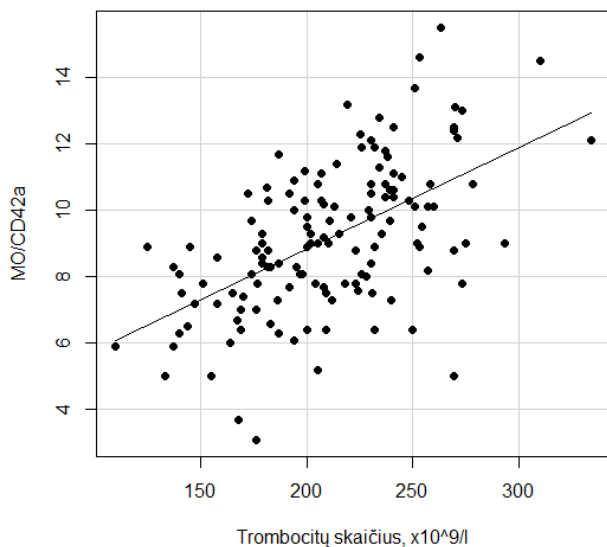


**3.14 pav.** Socialinės integracijos įtakos trombocitų agregatų ir žymenų raiškai įverčių palyginimas sveikų vidutinio amžiaus vyrų grupėje. X ašyje pavaizduoti agregatai ir žymenys, Y ašyje aktyvių agregatų/žymenų kiekis procentais. Duomenys vaizduojami histogramomis, rodančiomis medianas ir Q1, Q3 kvartilius.

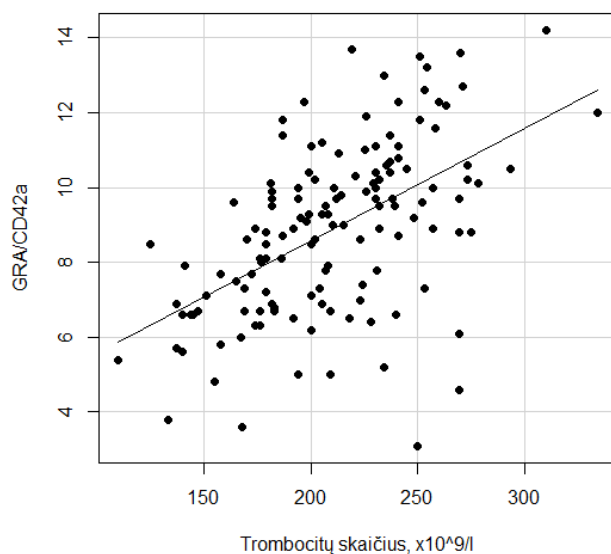
### 3.6. Trombocitų skaičiaus ir kitų tirtų rodiklių tarpusavio ryšys

Buvo patikrinta trombocitų skaičiaus priklausomybė su kitais trombocitų rodikliais. Trombocitų skaičius statistiškai reikšmingai, silpnai neigiamai koreliavo su MPV ( $r = -0,342$ ;  $p < 0,001$ ), PDW ( $r = -0,371$ ;  $p < 0,001$ ), P-LCR ( $r = -0,346$ ;  $p < 0,001$ ). PLT ryšys su trombokritu buvo labai stiprus ( $r = 0,910$ ;  $p < 0,001$ ). Nustatytos statistiškai reikšmingos, labai silpnos PLT koreliacijos su bendro cholesterolio ( $r = 0,178$ ,  $p = 0,037$ ), TAG ( $r = 0,174$ ,  $p = 0,041$ ), CRB ( $r = 0,170$ ,  $p = 0,047$ ) vertėmis.

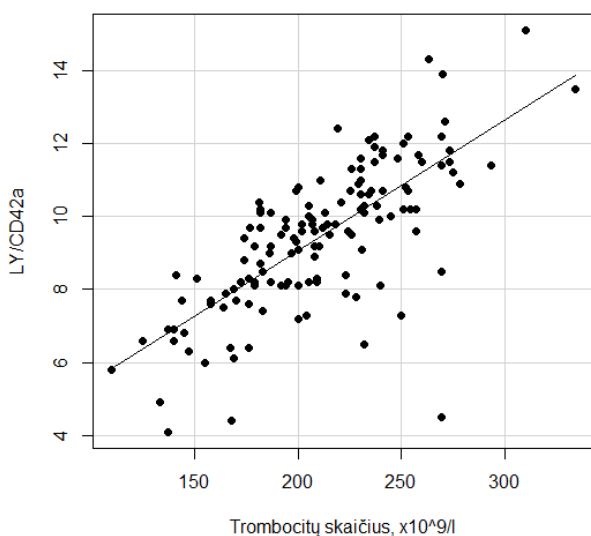
Atlikus trombocitų skaičiaus ir tėkmės citometrijos rezultatų koreliacinę analizę, nenustatyta jokių statistiškai reikšmingų PLT koreliacijų su CD63, CD107a, PAC-1, tiek be stimuliacijos, tiek stimuliacijos agonistais. Nustatyta statistiškai reikšminga teigiama PLT koreliacija su GRA/CD42a ( $r = 0,550$ ;  $p < 0,001$ ), LY/CD42a ( $r = 0,736$ ;  $p < 0,001$ ), MO/CD42a ( $r = 0,555$ ;  $p < 0,001$ ). Kadangi nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys, buvo atlikta tiesinės regresinės analizės išsiaiškinti, ar didesnis trombocitų skaičius lemia didesnę leukocitų – trombocitų agregatų kiekį. Nustatyta, kad tiesinės regresijos modeliai statistiškai reikšmingi (visais atvejais  $r^2 \geq 0,25$ ) ir tinkami nagrinėjamam ryšiui aprašyti (3.15; 3.16; 3.17 pav.). Taigi, galime teigti, kad esant didesniam trombocitų skaičiui susidarys daugiau leukocitų – trombocitų agregatų.



**3.15 pav.** Trombocitų skaičiaus ryšys su trombocitų – monocitų agregatų kiekiu ( $r^2 = 0,31$ ;  $y = 117,89 + 10,11 \times x$ ;  $p < 0,001$ ). X ašis vaizduoja trombocitų skaičių, Y ašis monocitų – trombocitų agregatus procentais.



**3.16 pav.** Trombocitų skaičiaus ryšys su trombocitų – granulocitų agregatų kiekiu ( $r^2 = 0,29$ ;  $y = 125,57 + 9,54 \times x$ ;  $p < 0,001$ ). X ašis vaizduoja trombocitų skaičių, Y ašis granulocitų – trombocitų agregatus procentais.



**3.17 pav.** Trombocitų skaičiaus ryšys su trombocitų – limfocitų agregatų kiekiu ( $r^2 = 0,53$ ;  $y = 70,62 + 14,83 \times x$ ;  $p < 0,001$ ). X ašis vaizduoja trombocitų skaičių, Y ašis limfocitų – trombocitų agregatus procentais.

### 3.7. Tirtų žymenų ir agregatų ryšys su kitais tirtais rodikliais

CD63, CD107a ir PAC-1 koreliacija nei su vienu iš antropometrinių duomenų ar biocheminių rodiklių nebuvo nustatyta. CD63 statistiškai reikšmingai teigiamai koreliavo su MPV

( $r = 0,236$ ,  $p = 0,005$ ), PDW ( $r = 0,223$ ,  $p = 0,009$ ), P-LCR ( $r = 0,243$ ,  $p = 0,004$ ). Kiti žymenys su trombocitų rodikliais koreliacijos nerodė. CD63, CD107a ir PAC-1 žymenys tarpusavyje koreliavo statistiškai reikšmingai (žr. Lentelė 3.18).

**3.18 lentelė.** CD63, CD107a ir PAC-1 žymenų tarpusavio koreliacija.

	<b>CD63</b>	<b>CD107a</b>	<b>PAC-1</b>
<b>CD63</b>		$r = 0,280$ , $p = 0,001$	$r = 0,360$ , $p < 0,001$
<b>CD107a</b>	$r = 0,280$ , $p = 0,001$		$r = 0,184$ , $p = 0,031$
<b>PAC-1</b>	$r = 0,360$ , $p < 0,001$	$r = 0,184$ , $p = 0,031$	

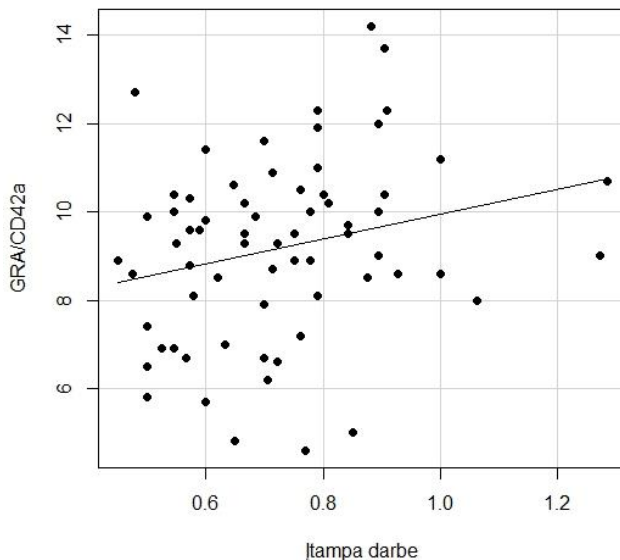
Trombocitų agregatų su monocitais, granulocitais, limfocitais koreliacijos rezultatai:

- MO/CD42a statistiškai reikšmingai koreliavo su ūgiu ( $r = -0,184$ ;  $p = 0,031$ ), leukocitų skaičiumi ( $r = 0,189$ ;  $p = 0,026$ ), neutrofilų skaičiumi ( $r = 0,172$ ;  $p = 0,044$ ), monocitų skaičiumi ( $r = 0,199$ ;  $p = 0,020$ ), MPV ( $r = -0,199$ ;  $p = 0,019$ ), PDW ( $r = -0,213$ ;  $p = 0,012$ ), P-LCR ( $r = -0,208$ ;  $p = 0,014$ ), PCT ( $r = 0,502$ ;  $p < 0,001$ ), GRA/CD42a ( $r = 0,739$ ;  $p < 0,001$ ), LY/CD42a ( $r = 0,829$ ;  $p < 0,001$ ), bendru cholesteroliu ( $r = 0,212$ ;  $p = 0,013$ ), TAG ( $r = 0,174$ ;  $p = 0,041$ ), MTL ( $r = 0,191$ ;  $p = 0,025$ ).
- GRA/CD42a statistiškai reikšmingai koreliavo su SKS ( $r = 0,263$ ;  $p = 0,002$ ), DKS ( $r = 0,177$ ;  $p = 0,038$ ), leukocitų skaičiumi ( $r = 0,240$ ;  $p = 0,005$ ), neutrofilų skaičiumi ( $r = 0,201$ ;  $p = 0,018$ ), monocitų skaičiumi ( $r = 0,225$ ;  $p = 0,008$ ), MPV ( $r = -0,272$ ;  $p = 0,001$ ), PDW ( $r = -0,284$ ;  $p = 0,001$ ), P-LCR ( $r = -0,280$ ;  $p = 0,001$ ), PCT ( $r = 0,474$ ;  $p < 0,001$ ), MO/CD42a ( $r = 0,739$ ;  $p < 0,001$ ), LY/CD42a ( $r = 0,806$ ;  $p < 0,001$ ).
- LY/CD42a statistiškai reikšmingai koreliavo su ūgiu ( $r = -0,223$ ;  $p = 0,009$ ), SKS ( $r = 0,196$ ;  $p = 0,021$ ), DKS ( $r = 0,178$ ;  $p = 0,036$ ), leukocitų skaičiumi ( $r = 0,314$ ;  $p < 0,001$ ), neutrofilų skaičiumi ( $r = 0,270$ ;  $p = 0,001$ ), limfocitų skaičiumi ( $r = 0,212$ ;  $p = 0,012$ ), monocitų skaičiumi ( $r = 0,237$ ;  $p = 0,005$ ), MPV ( $r = -0,419$ ;  $p < 0,001$ ), PDW ( $r = -0,426$ ;  $p < 0,001$ ), P-LCR ( $r = -0,427$ ;  $p < 0,001$ ), PCT ( $r = 0,610$ ;  $p < 0,001$ ), MO/CD42a ( $r = 0,829$ ;  $p < 0,001$ ), GRA/CD42a ( $r = 0,806$ ;  $p < 0,001$ ).

### 3.8. Psichosocialinio streso klausimyno ryšys su trombocitų aktyvacijos žymenimis ir agregatais

Darbe buvo patikrinta psichosocialinio streso klausimyno vertintų dalių atsakymo balų sąsaja su trombocitų rodikliais, tirtais trombocitų aktyvacijos žymenimis ir agregatais. Koreliacijos tikrintos atskirai abiejose amžiaus grupėse. Nustatyta, kad statistiškai reikšmingai silpnai teigiami koreliavo jaunų vyrų įtampos darbe įvertinimas balais su granulocitų – trombocitų agregatų procentu ( $r = 0,260$ ;  $p = 0,031$ ). Kadangi nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys, buvo atlikta tiesinės regresinės analizė išsiaiškinti, ar didesnė įtampa darbe, įvertinta balais, įtakoja granulocitų – trombocitų agregatų kiekį. Nustatyta, kad tiesinės regresijos modelis nėra statistiškai reikšmingas ir tinkamas nagrinėjamam ryšiui aprašyti ( $r^2 = 0,06$ , būtina sąlyga  $r^2 \geq 0,25$ ) (3.18 pav.). Taigi, negalime teigti, kad tikrai visada kuo daugiau balų tiriamasis įvertins savo patiriamą įtampą darbe, tuo daugiau granulocitų – trombocitų agregatų jam bus nustatyta.

Taip pat arti reikšmingumo ribos buvo jaunų vyrų emocinės paramos įvertinimo balais koreliacija su monocitų – trombocitų agregatų procentu ( $r = -0,212$ ;  $p = 0,081$ ). Kitų tirtų klausimyno dalių kiekybinis įvertinimas, nei jaunuose, nei vyresnio amžiaus vyruose su tirtais rodikliais nekoreliavo.



**3.18 pav.** Jaunų vyrų įtampos darbe įvertinimo balais ryšys su granulocitų – trombocitų agregatų kiekiu ( $r^2 = 0,06$ ;  $y = 7,15 + 2,81 \times x$ ). X ašis vaizduoja įtampos darbe balus, Y ašis granulocitų – trombocitų agregatus procentais.

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Stresas gali sukelti endotelio funkcijos, hemostazės procesų sutrikimus, uždegiminių citokininų gamybą, o visa tai veda link širdies ir kraujagyslių ligų vystymosi [2, 43]. Literatūros duomenimis stresas veikdamas hemostazę, didina prokoaguliacijos žymenų aktyvumą, o būtent lėtinis stresas dar ir mažina fibrinolizinį aktyvumą, ilgainiui skatindamas lėtinę padidėjusio krešėjimo būseną, taip didindamas trombozinių ligų riziką [43]. Natūralu, kad nutarėme nustatyti lėtinio streso ir trombocitų aktyvacijos žymenų raiškos sąsają. Siekiant įvertinti vien tik lėtinio streso įtaką trombocitų žymenų raiškos pokyčiams nepriklausomai nuo kitų veiksnių, tyrimui buvo atrinkti tik sveiki vyriškos lyties asmenys. Be to vyriška lytis yra tinkamesnė, nes moterims būdingas trombocitų hiperaktyvumas [70].

Tėkmės citometrijos metodu buvo tiriamas trombocitų funkcinis aktyvumas, vertinant sekrecinį ir agregacinį aktyvumus. Darbe pasirinkome naudoti tam tikrus žymenis: CD63, CD107a, PAC-1, CD42a, CD61, CD45, CD14. CD45 naudojamas atskirti leukocitams, CD14 – monocitams, CD42a ir CD61 – trombocitų žymenis. Agregacinis aktyvumas vertinamas derinant CD42a su CD14, taip atpažįstami monocitų – trombocitų kompleksai, kitų leukocitų kompleksai su trombocitais atpažįstami derinant CD42a/CD45. CD63 ir CD107a atpažįsta lizosomų ir tankiųjų granulių membranose esančius baltymus, po aktyvacijos patekusius į plazminę membraną, todėl šie žymenis naudojami trombocitų sekreciniam aktyvumui įvertinti [35, 36]. PAC-1 jungiasi fibrinogeno prisijungimo vietoje, kuri atsiranda aktyvinius trombocitus ir įvykus konformaciniams glikoproteino IIb/IIIa pokyčiams. Taigi jis taip pat naudojamas trombocitų aktyvumui įvertinti [31]. Apžvelgiant literatūrą tyrėjai dažnai trombocitų aktyvacijai vertinti naudoja P-selektiną, tačiau mes jo nesirinkome, nes monocitų – trombocitų agregatai yra jautresnis žymuo [71], be to P-selektinas labiau tinkamas ūmiam stresui vertinti [37]. Taip pat mes tyrėme būtent trombocitų paviršiaus žymenis, o ne tirpius plazmos žymenis, nes įrodyta, kad kai kurie jų gali būti išskirti endotelio ląstelių [36].

Dažniausiai streso vertinimui naudojami tokie žymenis, kaip kortizolis, seilių  $\alpha$  amilazė, imonologiniai žymenis (uždegiminiai citokinai) [5]. Trombocitų aktyvacijos žymenų raiškos ar agregatų tyrimų vertinant stresą, atlikta labai mažai. Ypač mažai tyrimų, kuriuose būtų vertintas tik lėtinis stresas ir tirti tik sveiki asmenys, todėl šiame darbe gautus rezultatus sunku lyginti ir vertinti. Daugiau tyrimų su sveikais asmenimis yra atlikta vertinant trombocitų atsaką į ūmų stresą. Malkoff su kolegomis tyrė sveikų jaunų vyrų trombocitų aktyvumą ūmaus psichologinio streso poveikyje ir nustatė, kad trombocitų sekrecinis aktyvumas prieš stimulą ir po reikšmingai skiriasi. Jų darbe buvo įtraukta kontrolinė grupė, kuriai ūmus stimulus nebuvo

taikomas, o rezultatai šioje grupėje trombocitų sekrecinio aktyvumo nerodė. Galima manyti, kad kontrolinė grupė patiria tik lėtinį gyvenimo stresą, todėl jo poveikio trombocitų sekrecijai ir agregacijai nenustatyta [72]. Priešingus rezultatus gavo Lederbogen su kolegomis tirdami sergančius depresija ir sveikus asmenims. Jie naudodami CD63 ir P-selektino žymenis negavo reikšmingo aktyvacijos žymenų pokyčio sveikiems asmenims net taikydami ūmius streso veiksnius, fizinį aktyvumą ir psichologinį testą. Pokytį nustatė tik sergantiems [36].

Stephoe ir bendraautoriai tirdami sveikų vidutinio amžiaus vyrų trombocitų – leukocitų agregatų pokyčius ūmaus streso įtakoje nustatė, kad jis reikšmingai padidina visų trijų tipų (trombocitų – monocitų, trombocitų – neutrofilų, trombocitų – limfocitų) cirkuliuojančių agregatų kiekį. Steptoe tyrime vyrai griežtai buvo suskirstyti pagal aukštą ir žemą socioekonominį statusą, kuris buvo laikomas lėtinio streso veiksnium. Žemesnio socialinio sluoksnio grupės vyrams nustatytas didesnis visų tipų agregatų skaičius nei priklausantiems aukštesniam sluoksniui, tiek prieš stresinį stimulą, tiek po. Taip pat nustatyta, kad, nors atsakė į stimulą agregatų kiekis padidėja abiejose grupėse, atsako stiprumas nesiskiria. Autoriai teigia, kad žemo socioekonominio sluoksnio vyrams dėl streso nerandama didesnės trombocitų aktyvacijos, nes jie lėtinio streso patiria dažniau ir daugiau [2].

Kadangi mūsų darbe tirta tik lėtinio streso įtaka, gautus rezultatus galime palyginti nebent su Steptoe ir kolegų išmatuotu agregatų skaičiumi pradiniam taške iki ūminio streso stimulo. Jiems pavyko aptikti reikšmingus agregatų kiekio skirtumus lėtinio streso įtakoje, tačiau mes savo darbe to neradome. Arti reikšmingumo lygmens ribos ( $p = 0,059$ ,  $p = 0,081$ ) gavome tik agregatų pokytį kaip lėtinio streso veiksnį vertindami emocinės paramos įtaką. Tvirtai teigti, kad mūsų rezultatai priešingi negalime, nes mūsų tiriamieji nebuvo taip griežtai suskirstyti į patiriančius lėtinį stresą ir ne.

Remiantis tuo, kad stresas skatina širdies ir kraujagyslių ligas, panašūs streso poveikio tyrimai atliekami su asmenimis, kurių patofiziologinės būklės siejamos su tomis ligomis, lyginant jų tyrimo rezultatus su kontroline sveikų asmenų grupe. Aprašyta atvejų apie trombocitų aktyvacijos padidėjimą lėtinio streso įtakoje pacientams sergantiems koronarine širdies liga lyginant su sveika kontroline grupe [1, 73, 74, 75].

Frimerman su bendraautoriais vertino streso darbe įtaką trombocitų agregatams ir nustatė, kad didelė įtampa darbe padidina agregatų kiekį. Jie kraujo mėginius iš tiriamųjų rinko įtemptu darbo laikotarpiu (gale metų) ir ramiuoju periodu, o trombocitų agregaciją skatino ADF [46]. Mūsų tyrime tikrindami įtampos darbe bei naktinio darbo poveikį trombocitų aktyvumui esminių skirtumų tarp tiriamųjų grupių nenustatėme. Naktinio darbo grupėje rastas reikšmingas ( $p = 0,036$ ) CD63 žymens raiškos skirtumas po stimuliacijos TRAP agonistu. Tačiau mūsų tiriamieji

patiriamą įtampą darbe įvertino kaip žemą, taigi tiriamųjų grupės dideliu įtampos darbe skirtumu nesiskyrė.

Tirdami rūkymo įtaką trombocitų aktyvumui nustatėme reikšmingą ( $p = 0,028$ ) CD63 žymens padidėjimą aktyvinant TRAP, tačiau kitų žymenų aktyvumas nebuvo nustatytas. Daugelio autorių duomenimis rūkymas aktyvina trombocitus, Nair su kolegomis nustatė reikšmingą rūkymo įtaką trombocitų aktyvacijai, tačiau jie naudojo P-selektino, CD41 žymenis ir ADF agonistą [76].

Savo darbe tikrindami CD63, CD107a ir PAC-1 žymenų tarpusavio koreliacijas su antropometriniais tiriamųjų svorio duomenimis jų nenustatėme, su svoriu nekoreliavo ir trombocitų skaičius. Tokius pat duomenis gavo ir Samocha-Bonet su kolegomis tirdami antsvorį turinčius asmenis. Jie nustatė, kad vyriškos lyties asmenims svoris ar nutukimas neturi įtakos trombocitų aktyvacijai ir trombocitų skaičiui [77]. Trombocitų agregatai taip pat nekoreliavo su KMI, panašius rezultatus gavo ir Steptoe su kolegomis [2].

Nenustatėme CD63, CD107a ir PAC-1 žymenų raiškos koreliacijų su uždegiminiais rodikliais (CRB, leukocitų skaičiumi), mūsų rezultatai atitiko kitų mokslininkų gautus rezultatus, nors jie naudojo PAC-1 ir P-selektino žymenis [77, 78, 79, ].

Mūsų gauti rezultatai rodo, kad trombocitų skaičiaus pokytis nėra susijęs su trombocitų aktyvacija, tačiau susijęs su didesniais trombocitų – leukocitų agregatų kiekiais. Taip pat nustatėme, kad didėjant MPV didėja CD63 žymens sekrecija (CD107a ir PAC-1 žymenims to nenustatėme), tai yra didėja trombocitų aktyvinimas, bet kartu mažėja trombocitų – monocitų, trombocitų – granulocitų, trombocitų – limfocitų agregatų. Taigi didesnio tūrio trombocitai sudaro mažiau agregatų, tačiau yra aktyvesni. Remiantis jau minėtais kitų autorių rezultatais, kad stresas padidina trombocitų – leukocitų kompleksų skaičių, galima manyti, kad asmenims, kurių trombocitų skaičius didesnis ir MPV mažesnis patiriant daugiau streso susidarys daugiau agregatų.

Vertindami psichosocialinio streso klausimyno atskirų dalių atsakymo balų sąsają su trombocitų rodikliais, trombocitų aktyvacijos žymenimis ir agregatais, reikšmingą koreliaciją nustatėme tik tarp jaunų vyrų įtampos darbe balais ir granulocitų – trombocitų agregatų kiekio ( $r = 0,260$ ;  $p = 0,031$ ). Tačiau taikant tiesinės regresinės analizės metodą ši koreliacija nepasitvirtino ( $r^2 = 0,06$ , būtina sąlyga  $r^2 \geq 0,25$ ).

Iš mūsų gautų trombocitų agregatų koreliacijos su kitais rodikliais rezultatų galima pastebėti tendenciją koreliacijai su TAG, MTL, bendru cholesteroliu, leukocitais, DKS, SKS, o tai rodo agregatų ryšį su veiksniais kurie prisideda prie širdies ir kraujagyslių ligų vystymosi. Kaip teigiama literatūroje, psichosocialinis stresas prisideda prie širdies ir kraujagyslių ligų vystymosi



[47], tačiau mes savo darbe lėtinio streso įtakos trombocitų aktyvumui nenustatėme, bet koreliacijas tarp rizikos veiksnių aptikome.

Apibendrinant mūsų gautus rezultatus, lėtinio streso įtakos trombocitų aktyvacijos žymenų raiškai nenustatėme, tačiau tiksliai vertinti ir daryti išvadas sunku, nes panašių tyrimų, vertinančių būtent lėtinį stresą tik sveikuose asmenyse, beveik nėra atlikta. Taip pat norint tiksliau įvertinti streso įtaką trombocitų aktyvacijai reikėtų tirti akivaizdžiai skirtingą streso lygį patiriančių asmenų grupes, bei atrinkti kiek galima panašesnius duomenis turinčių asmenų grupes. Galime teigti, kad mūsų tyrimo modelio rezultatais prisidedame prie lėtinio streso nagrinėjimo ir pateikiame apie tai papildomos informacijos.

## IŠVADOS

1. Skirtingas amžius trombocitų aktyvacijos žymenų CD63, CD107a ir PAC-1 raiškai, bei trombocitų – leukocitų agregatų kiekiui įtakos neturi. Dėl stimuliavimo agonistais būdingas CD107a ir PAC-1 žymenų raiškos padidėjimas jaunų vyrų grupėje.
2. Lėtinis stresas neturi statistiškai reikšmingos įtakos sveikų jaunų ir vidutinio amžiaus vyrų trombocitų sekreciniam ir agregaciniam aktyvumui.
3. Sveikiems vyrams trombocitų žymenų CD63, CD107a ir PAC-1 sąsajų su antropometriniiais duomenimis, biocheminiais ir uždegiminiais rodikliais nėra. Didesnis trombocitų skaičius teigiamai koreliuoja su didesniu trombocitų – leukocitų agregatų kiekiu, o didėjant vidutiniam trombocitų tūriui didėja aktyvacijos žymenų sekrecija, bet susidaro mažiau agregatų. Pastebėta tendencija teigiamai trombocitų – leukocitų agregatų koreliacijai su biocheminiais aterosklerozės rizikos veiksniais.

## SUMMARY

### **The Influence of Chronic Stress on Platelet Activation Marker's Expression in Groups of Younger and Middle-aged Males**

Stress is an inevitable part of everyday life. This state of body and mind can be divided into two kinds – the acute and chronic stress. The latter one is especially harmful since the stress response is always activated and therefore affecting many parts of human body. Stress is associated with cardiovascular diseases; different stressors can affect neuroendocrine, immune, central nervous systems. Moreover, stress has the impact on hemostasis and the process of thrombosis. Although it has long been known that stress alters with cardiovascular system, there are very few researches on how stress influences platelets.

**The aim of this study** was to evaluate the influence of chronic stress on platelet activation marker's expression in groups of young (25 – 39 years old) and middle-aged (40 – 55 years old) males.

**Patients and Methods:** Participants were 138 healthy males aged 25 – 55 years. They were divided into young and middle-aged groups. Venous blood was drawn without putting participants into stressful environment. Afterwards, platelet activation markers and platelet-leukocyte aggregates were analyzed using flow cytometry. Blood parameters and platelet counts were measured using automated hematology analyzer. The statistical analysis was performed using R program and GraphPad Prism 6.

**Results and Conclusions:** No significant influence of age on platelet activation markers CD63, CD107a, PAC-1 and platelet-leukocyte aggregates was found. Increased platelet activation markers CD107a and PAC-1 in response to platelet agonists have been found among young males. There was no significant impact of chronic stress on the increase of aggregation or secretion of platelet activation markers in both age groups. Significantly increased platelet activation marker CD63 in response to platelet agonist thrombin receptor-activating peptide has been found in smoking males and males working nightshifts. No correlation between CD63, CD107a, PAC-1 platelet markers and anthropometric data, biochemical and inflammatory mediators has been found. Correlational analysis showed a positive relationship between platelet count and platelet-leukocyte aggregates. Positive relationship was determined between mean platelet volume and secretion of platelet activation markers but MPV negatively correlated with aggregates. Correlation between aggregates and biochemical risk factors of atherosclerosis was determined.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Brydon L, Magid K, Steptoe A. Platelets, coronary heart disease, and stress. *Brain Behav Immun.* 2006;20(2):113–9.
2. Steptoe A, Magid K, Edwards S, Brydon L, Hong Y, Erusalimsky J. The influence of psychological stress and socioeconomic status on platelet activation in men. *Atherosclerosis.* 2003;168(1):57–63.
3. Hjemdahl P. *Stress and Cardiovascular Disease.* 2012.
4. Becker R, Silvi J, Ma FD, L'Hours A, Laurenti R. A method for deriving leading causes of death. *Bull World Heal Organ.* 2006;84(0042–9686):297–304.
5. Golbidi S, Frisbee JC, Laher I. Chronic stress impacts the cardiovascular system: animal models and clinical outcomes. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2015;308(12):H1476–98.
6. Matsuhisa F, Kitamura N, Satoh E. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. *Stress.* 2014;17(2):186–92.
7. Saboor M, Ayub Q, Ilyas S, Moinuddin. Platelet receptors: An instrumental of platelet physiology. *Pakistan J Med Sci.* 2013;29(3).
8. Koudouovoh-Tripp P. Influence of mental stress on platelet bioactivity. *World J Psychiatry.* 2012;2(6):134.
9. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *Sci World J.* 2014;2014.
10. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets. *Leuk Res.* 2007;31(10):1339–41.
11. McNicol A, Israels SJ. Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2008;8(2):99–117.
12. Garraud O, Cognasse F. Are platelets cells? And if yes, are they immune cells? *Front Immunol.* 2015;6:1–8.
13. Wachowicz B, Morel A, Miller E, Saluk J. The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. *Acta Neurobiol Exp.* 2016;76:269–81.
14. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1–5.
15. Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F. Platelets and cytokines: How and why? *Transfus Clin Biol.* 2012;19(3):104–8.
16. Grozovsky R, Giannini S, Falet H, Hoffmeister KM. Regulating billions of blood platelets: Glycans and beyond. *Blood.* 2015;126(16):1877–84.
17. Van Velzen JF, Laros-Van Gorkom BAP, Pop GAM, Van Heerde WL. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. *Thromb Res.* 2012;130(1):92–8.
18. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikström-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-Leukocyte Cross Talk in Whole Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(12).
19. Mekaj YH. The roles of platelets in inflammation, immunity, wound healing and malignancy. *Int J Clin Exp Med.* 2016;9(3):5347–58.
20. Saboor M, Moinuddin M, Ilyas S. Flow cytometry based chronologic analysis of surface glycoproteins of resting and stimulated platelets in normal individuals. *Pakistan J Med Sci.* 2012;28(4):625–9.

21. Van Rooy MJ, Pretorius E. Metabolic syndrome, platelet activation and the development of transient ischemic attack or thromboembolic stroke. *Thromb Res.* 2015;135(3):434–42.
22. Angiolillo DJ, Ueno M, Goto S. Basic Principles of Platelet Biology and Clinical Implications. *Circ J.* 2010;74(4):597–607.
23. Mitsui C, Kajiwara K, Hayashi H, Ito J, Mita H, Ono E, *et al.* Platelet activation markers overexpressed specifically in patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(2):400–11.
24. Gerdes N, Seijkens T, Lievens D, Kuijpers MJE, Winkels H, Projahn D, *et al.* Platelet CD40 exacerbates atherosclerosis by transcellular activation of endothelial cells and leukocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(3):482–90.
25. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood.* 2007;109(12).
26. CD Antigens Table <http://www.immunologylink.com/cdantigen.html>
27. Leslie M. Beyond Clotting: The Powers of Platelets. *Science.* 2010;328(5978).
28. Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D. The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(6):445–57.
29. Lutgens E, Daemen MJA. CD40-CD40L Interactions in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(1):27–32.
30. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(7):425–30.
31. Gurney D, Lip GYH, Blann AD. A reliable plasma marker of platelet activation: Does it exist? *Am J Hematol.* 2002;70(2):139–44.
32. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem.* 1985;260(20):11107–14.
33. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
34. Pathology Outlines - CD Markers <http://www.pathologyoutlines.com/cdmarkers.html>
35. Israels SJ, McMillan-Ward EM. CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen. *Thromb Haemost.* 2005;93(2):311–8.
36. Lederbogen F, Baranyai R, Gilles M, Menart-Houtermans B, Tschoepe D, Deuschle M. Effect of mental and physical stress on platelet activation markers in depressed patients and healthy subjects: A pilot study. *Psychiatry Res.* 2004;127(1–2):55–64.
37. Nagy B, Debreceni B, Kappelmayer J. Flow Cytometric Investigation of Classical and Alternative Platelet Activation Markers. *EJIFCC.* 2013;23(4): 124–134.
38. McEver RP. CHAPTER 12 – P-Selectin/PSGL-1 and Other Interactions between Platelets, Leukocytes, and Endothelium. 2007;p. 231–49.
39. Doyle EL, Ridger V, Ferraro F, Turmaine M, Saftig P, Cutler DF. CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood.* 2011;118(15):4265–73.
40. Michelson AD, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, *et al.* In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(21):11877–82.
41. Michelson AD, Furman MI. Markers of Platelet Activation and Granule Secretion. In: *Platelet Function.* Totowa, NJ: Humana Press; 2005:301–14.
42. Gremmel T, Ay C, Riedl J, Kopp CW, Eichelberger B, Koppensteiner R, *et al.* Platelet-specific markers are associated with monocyte-platelet aggregate formation and thrombin

- generation potential in advanced atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 2015;115(3):615–21.
43. Austin AW, Wissmann T, Von Kanel R. Stress and hemostasis: An update. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(8):902–12.
  44. *The Handbook of Stress Science Biology, Psychology, and Health-9780826114716|Springer Publishing Company;2010.*
  45. Schneiderman N, Ironson G, Siegel S D. Stress and health: Psychological, Behavioral, and Biological Determinants. *Annu Rev Clin Psychol.* 2008;1:607–628.
  46. Frimerman A, Miller HI, Laniado S, Keren G. Changes in Hemostatic Function at Times of Cyclic Variation in Occupational Stress. *Am J Cardiol.* 1997;79(1):72–5.
  47. Rozanski A, Blumenthal JA, Davidson KW, Saab PG, Kubzansky L. The epidemiology, pathophysiology, and management of psychosocial risk factors in cardiac practice: The emerging field of behavioral cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(5):637–51.
  48. Parakh K, Sakhuja A, Bhat U, Ziegelstein RC. Platelet Function in Patients with Depression. *South Med J.* 2008;101(6):612–7.
  49. Williams MS. Platelets and depression in cardiovascular disease: A brief review of the current literature. *World J Psychiatry.* 2012;2(6):114.
  50. von Känel R, Dimsdale JE. Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis in vivo. *Eur J Haematol.* 2000;65(6):357–69.
  51. Muck-Seler D, Pivac N, Mustapic M, Crncevic Z, Jakovljevic M, Sagud M. Platelet serotonin and plasma prolactin and cortisol in healthy, depressed and schizophrenic women. *Psychiatry Res.* 2004;127(3):217–26.
  52. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Heal Risk Manag.* 2015;11:133–48.
  53. Zhou L, Schmaier AH. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol.* 2005;123(2):172–83.
  54. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, *et al.* Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol.* 2011;155(1):30–44.
  55. De Cuyper IM, Meinders M, van de Vijver E, de Korte D, Porcelijn L, de Haas M, *et al.* A novel flow cytometry – based platelet aggregation assay. *Blood.* 2013;121(10):70–80.
  56. Orfao A, Ruiz-Arguelles A, Lacombe F, Ault K, Basso G, Danova M. Flow cytometry: Its applications in hematology. *Haematologica.* 1995;80(1):69–81.
  57. Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2006;35(1–2):67–82.
  58. Matuzevičienė R. *Tėkmės citometrija ir jos taikymas laboratorinėje medicinoje.* Vilnius: UAB „Petro ofsetas“ l-kla; 2013.
  59. Flow cytometry introduction | Abcam <http://www.abcam.com/protocols/introduction-to-flow-cytometry>
  60. Muhammad S, Moinuddin M, Samina I. Brief Communication New Horizons in Platelets Flow Cytometry. 2013;20:62–6.
  61. Schmidt V, Hilberg T, Franke G, Gläser D, Gabriel HHW. Paraformaldehyde fixation induces a systematic activation of platelets. *Platelets.* 2003;14(5):287–94.
  62. Hu H, Daleskog M, Li N. Influences of fixatives on flow cytometric measurements of

- platelet P-selectin expression and fibrinogen binding. *Thromb Res.* 2000;100(3):161–6.
63. Cahill MR, Macey MG, Newland AC. Fixation with formaldehyde induces expression of activation dependent platelet membrane glycoproteins, P selectin (CD62) and GP53 (CD63). *Br J Haematol.* 1993;84(3):527–9.
  64. Chae H, Park HH. EDTA Inhibits the Binding of Clone 96.2C1, an Anti-CD41a Monoclonal Antibody, to the Platelets and Addition of Heparin and CaCl<sub>2</sub> to the Antibody Neutralizes the EDTA-induced Inhibitory Effect. *Korean J Hematol.* 2009;44(1):42.
  65. Ritchie JL, Alexander HD, Rea IM. Flow cytometry analysis of platelet P-selectin expression in whole blood--methodological considerations. *Clin Lab Haematol.* 2000;22(6):359–63.
  66. Harrison P. Assessment of platelet function in the laboratory. *Hamostaseologie.* 2009;29(1):25–31.
  67. Kristenson M, Kucinskienė Z, Bergdahl B, Calkauskas H, Urmonas V, Orth-Gomér K. Increased psychosocial strain in Lithuanian versus Swedish men: the LiVicordia study. *Psychosom Med.* 1998;60(3):277–82.
  68. Czepluch FS, Kuschicke H, Dellas C, Riggert J, Hasenfuss G, Schäfer K. Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med.* 2014;275(2):144–54.
  69. Van Der Zee PM, Biró É, Ko Y, De Winter RJ, Hack CE, Sturk A, *et al.* P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. *Clin Chem.* 2006;52(4):657–64.
  70. Bray PF. Platelet Hyperreactivity: Predictive and Intrinsic Properties. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21(4):633–45.
  71. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating Monocyte-Platelet Aggregates Are a More Sensitive Marker of In Vivo Platelet Activation Than Platelet Surface P-Selectin: Studies in Baboons, Human Coronary Intervention, and Human Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2001;104(13):1533–7.
  72. Malkoff SB, Muldoon MF, Zeigler ZR, Manuck SB. Blood platelet responsivity to acute mental stress. *Psychosom Med.* 1993;55(6):477–82.
  73. Strike PC, Magid K, Brydon L, Edwards S, Mcewan JR, Steptoe A. Exaggerated Platelet and Hemodynamic Reactivity to Mental Stress in Men With Coronary Artery Disease. *Psychosom Med.* 2004;66(4):492–500.
  74. Markovitz JH, Matthews KA, Kiss J, Smitherman TC. Effects of hostility on platelet reactivity to psychological stress in coronary heart disease patients and in healthy controls. *Psychosom Med.* 1996;58(2):143–9.1
  75. Kubzansky LD, Kawachi I. Going to the heart of the matter: Do negative emotions cause coronary heart disease? *J Psychosom Res.* 2000;48(4–5):323–37.
  76. Nair S, Kulkarni S, Camoens HMT, Ghosh K, Mohanty D. Changes in platelet glycoprotein receptors after smoking – a flow cytometric study. *Platelets.* 2001;12(1):20–6.
  77. Samocha-Bonet D, Justo D, Rogowski O, Saar N, Abu-Abeid S, Shenkerman G, *et al.* Platelet counts and platelet activation markers in obese subjects. *Mediators Inflamm.* 2008;2008.
  78. Marcucci R, Valente S, Gori AM, Chiostrri M, Paniccia R, Giusti B, *et al.* Global platelet hyperreactivity and elevated C-reactive protein levels predict long term mortality in STEMI patients. *Thromb Res.* 2014;134(4):884–8.
  79. Dogru T, Tasci I, Sonmez A, Genc H, Gok M, Yilmaz MI, *et al.* The plasma levels of soluble P-selectin in subjects with prediabetes. *Int J Clin Pract.* 2006;60(9):1048–52.

## 1 PRIEDAS

Ėminys	Analitės trumpinys	Paslaugos pavadinimas		Interpretacija, rekomenduojamos ribos
Veninis kraujas su EDTA		Kraujo tyrimas automatizuotu būdu:	Amžius	
	WBC	Leukocitai ( $\times 10^9/l$ )	>18m.	4,0-9,8
	Neut	Neutrofilai ( $\times 10^9/l$ )	>18m.	1,5-6,0
	Lymph	Limfocitai ( $\times 10^9/l$ )	>18m.	1,0-4,0
	Mono	Monocitai ( $\times 10^9/l$ )	>1m.	0,1-0,9
	Eo	Eozinofilai ( $\times 10^9/l$ )		0-0,7
	Baso	Bazofilai ( $\times 10^9/l$ )		0-0,11
	Neut	Neutrofilai (%)	>18m.	40-65
	Lymph	Limfocitai (%)	>18m.	25-37
	Mono	Monocitai (%)	0 d.-2 sav.	2-10
	Eo	Eozinofilai (%)		0-5
	Baso	Bazofilai (%)		0-1
	RBC	Eritrocitai ( $\times 10^{12}/l$ )	>18m.	4,3-5,8
	Hgb	Hemoglobinas (g/l)	>18m.	128-160
	Hct	Hematokritas (%)	>18m.	40,0-48,0
	MCV	Vidutinis eritrocitų tūris (fL)	>18m.	78-96
	MCH	Vidutinis hemoglobino kiekis eritrocituose (pg)	>18m.	26-31
	MCHC	Vidutinė hemoglobino koncentracija eritrocituose (g/l)		310-370
	PLT	Trombocitai ( $\times 10^9/l$ )		140-450
	MPV	Vidutinis trombocitų tūris (fl)	$\geq 18$ m.	9,7-11,9
	PDW	Paskaičiuotas trombocitų pasiskirstymo plotis (fL)	$\geq 18$ m.	10,1-16,1
	PCT	Trombokritas (%)	$\geq 18$ m.	0,17-0,32
	P-LCR	Didelių trombocitų skaičiaus santykis su bendru trombocitų skaičiumi (%)	$\geq 18$ m.	18,5-42,3