

ДОСЛІДЖЕННЯ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ ГЕМОСТАЗУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АНТИФОСФОЛІПІДНОМУ СИНДРОМІ

Досліджено зміни показників системи згортання крові та рівень тромбоцитів за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому, який моделювали на мишах-самках лінії BALB/c. У результаті проведених досліджень у групі тварин із цим синдромом встановлено зменшення кількості тромбоцитів, укорочення протромбінового часу, збільшення протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого співвідношення.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антифосфоліпідний синдром, антифосфоліпідні антитіла, гемостаз.

ВСТУП. Антифосфоліпідний синдром (АФС) належить до найактуальніших мультидисциплінарних проблем сучасної медицини [2]. 20–30 % тромбозів глибоких вен розвиваються при наявності антифосфоліпідних антитіл, що виявляють у 42 % жінок, які перенесли інсульт, і 21 % пацієнтів після інфаркту міокарда віком до 45 років [3, 10]. Високий ризик інвалідизації, порушення репродуктивної функції в жінок надають цій проблемі соціального значення. Серед пацієток із невиношуванням вагітності АФС виявляють у 27–42 % випадків, водночас у 90–95 % жінок без адекватного лікування ембріон гине [5, 9].

Спочатку АФС описували як вид системного червоного вовчачка. Однак було встановлено, що АФС може розвиватися при інших аутоімунних ревматичних і неревматичних захворюваннях, злоякісних новоутвореннях, на фоні інфекцій, приймання лікарських препаратів [2].

Антифосфоліпідний синдром – аутоімунне захворювання, що характеризується наявністю в крові антитіл до негативно заряджених фосфоліпідів мембран, які містяться в плазмі крові, – фосфатидилсерину, кардіоліпіну, а також зв'язаних із цими фосфоліпідами глікопротеїнів (бета-2-глікопротеїну-1, анексину V, протромбіну) [1, 8, 9], причин утворення яких достовірно не встановлено. Взаємодія антитіл із фосфоліпідами клітинних мембран викликає конформаційні та метаболічні зміни в мембранах, порушення функцій клітин, гемостазу крові [1]. АФС проявляється тромбозом судин різних розміру і

локалізації, інсультом, акушерською патологією чи тромбоцитопенією [1, 5, 11].

Антифосфоліпідні антитіла здатні впливати на процеси регуляції гемостазу, а також через систему комплементу викликають імуноопосередковане порушення згортання крові. Їх пряма дія на систему згортання крові спричиняє гіперкоагуляцію [4].

За даними літератури, відомо декілька основних механізмів дії антифосфоліпідних антитіл на систему згортання крові [4, 9, 12]. Антифосфоліпідні антитіла можуть безпосередньо зв'язуватися з тромбіном, блокуючи його взаємодію з антитромбіном, а також із протеїном С і протеїном S, інгібуючи їх антикоагуляційну функцію. Антифосфоліпідні антитіла можуть впливати на тромбоцити і стимулювати їх активацію, що супроводжується підвищенням біосинтезу глікопротеїну 2b-3a і тромбоксану A2. Антифосфоліпідні антитіла можуть взаємодіяти з ендотеліальними клітинами і моноцитами, індукуючи в ендотелії утворення молекул адгезії. Антифосфоліпідні антитіла можуть активувати систему комплементу, що призводить до утворення тромбозів, клінічних симптомів [4, 9, 10].

Діагностику АФС використовують при виявленні венозних і артеріальних тромбозів різної локалізації, тромбоемболій, порушень кровопостачання мозку, ішемічних інсультів, а також при невиношуванні вагітності, помірній тромбоцитопенії та ін. У практичних лікарів до сьогодні виникають труднощі при встановленні діагнозу і призначенні лікування хворим з АФС [1, 2, 8].

© О. З. Яремчук, 2015.

Лабораторна діагностика АФС полягає у визначенні вовчакового антикоагулянта й антитіл до кардіоліпіну, рідше визначають рівень специфічних антитіл до фосфатидилсерину, фосфатидилінозиту, фосфатидилетаноламіну, а також до бета-2-глікопротеїну-1, анексину V, протромбіну [1, 2, 9]. Частота виявлення антифосфоліпідних антитіл до кардіоліпіну і вовчакового антикоагулянта в крові становить від 0 до 14 % та підвищується у людей похилого віку, особливо з хронічними захворюваннями [3].

Антитіла до фосфоліпідів – це автоімунні антитіла Ig G, Ig M, дія яких спрямована проти основних компонентів клітинних мембран – фосфоліпідів та, відповідно, власних клітин і тканин організму. Фосфоліпідні молекули можуть бути негативно зарядженими (фосфатидилсерин, кардіоліпін), позитивно зарядженими (фосфатидилінозитол, фосфатидилова кислота), нейтральними (фосфатидилхолін). Проте, незважаючи на назву “антифосфоліпідні антитіла”, розпізнають не фосфоліпідні молекули, а зв’язані з аніонною поверхнею білки плазми крові. У процесі взаємодії антифосфоліпідних антитіл з фосфоліпідами білки плазми відіграють роль кофакторів [1, 4]. Антитіла до фосфоліпідів порушують функціонування ендотелію кровеносних судин, викликаючи звуження судин і утворення тромбів. Важливу роль у процесі взаємодії антифосфоліпідних антитіл і ендотеліальних клітин відіграє бета-2-глікопротеїн-1 [1].

Механізм виникнення тромбозу у хворих із вовчаковим антикоагулянтом точно не встановлено, проте відомо, що антитіла до фосфоліпідів знижують продукування простагландину ендотеліальними клітинами, інгібуючи фосфоліпазу A₂, протеїн S, сприяючи тромбоемболоутворенню [1, 5].

Незважаючи на те, що патогенетичні механізми АФС вивчено достатньо, специфічні методи терапії АФС не досконалі, є високий ризик розвитку різноманітних ускладнень, зокрема кровотеч, тромбоцитопенії, остеопорозу та ін. [4, 5, 8, 9].

Метою даної роботи було дослідити показники системи згортання крові та рівень тромбоцитів за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на мишах лінії BALB/c, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти виконували відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних

тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). АФС моделювали на мишах лінії BALB/c із використанням кардіоліпіну (“Sigma”, США), який вводили внутрішньом’язово 4 рази (30 мкг на одну ін’єкцію, проміжки між ін’єкціями становили 14 діб) [6]. Для підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгували в 75 мкл повного ад’юванту Фрейнда (перша ін’єкція), наступні ін’єкції проводили з неповним ад’ювантом. АФС формувався через 2 тижні після останньої ін’єкції кардіоліпіну. Тварини контрольної групи отримували внутрішньочеревно ідентичний об’єм хлориду натрію.

Піддослідних тварин поділили на дві групи: 1-ша – інтактні; 2-га – миші з АФС. Через 10 діб з моменту підтвердження АФС по 10 мишей із кожної групи, за умов тіопентал-натрієвого наркозу (внутрішньочеревне введення 1 % розчину з розрахунку 50 мг/кг маси тварини), виводили з експерименту.

Дослідження проводили за допомогою двоканального напівавтоматичного коагулометра фірми “Humaclot Quo Human”. Визначали кількість тромбоцитів на автоматичному гематологічному аналізаторі.

Статистичну обробку результатів виконано у відділі системних статистичних досліджень Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського в програмному пакеті Statsoft STATISTICA. Порівнювали отримані величини з використанням U-критерію Манна–Уїтні. Зміни вважали достовірними при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті виконаних досліджень встановлено зниження кількості тромбоцитів у групі тварин з АФС на 12 % порівняно з інтактними (рис. 1).

Антифосфоліпідні антитіла, які зв’язуються з ендотелієм судин та факторами згортання,

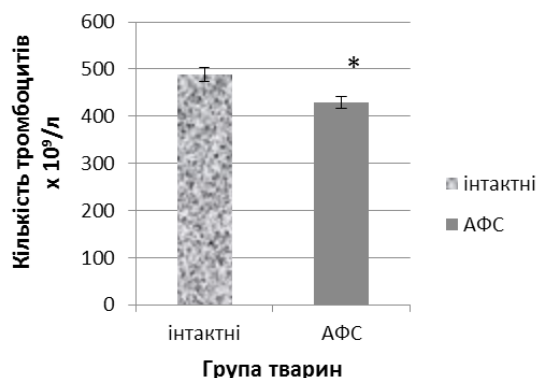


Рис. 1. Кількість тромбоцитів у крові інтактних тварин та за умов антифосфоліпідного синдрому (n=10).

Примітка. Тут і на рисунку 2: * – достовірність різниці відносно показників групи інтактних тварин.

сприяють тромбоутворенню, викликають посилення синтезу тромбоксану, підвищення концентрації цитозольного кальцію, що призводить до збільшення агрегації тромбоцитів, зв'язуються з мембраною активованих тромбоцитів, що пришвидшує руйнування останніх. Тромбоцитопенія зустрічається у 28 % випадків первинного АФС та в 22 % випадків вторинного АФС [10–12].

Проте активація тромбоцитів може бути пов'язана не лише з антифосфоліпідними антитілами, а й з дією антитромбоцитарних антитіл, які виявляють при системному червоному вовчаку з тромбоцитопенією, незалежно від концентрації антифосфоліпідних антитіл [3].

Антитіла до фосфатидилсерину, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотеліальних клітин судин, викликають їх порушення, розвиток тромбозів та тромбоемболій. З аніонних антифосфоліпідних антитіл фосфатидилсерин, який знаходиться на внутрішній поверхні тромбоцитів і клітинних мембран ендотелію судин, є найбільш антигенним. При активації клітин фосфатидилсерин переміщується на поверхню клітини, входить у протромбіназний комплекс і, таким чином, бере участь у формуванні тромбу [1].

Встановлено, що у мишей з АФС відбувалося вкорочення активованого часткового тромбопластинового часу (АЧТЧ) на 19 % порівняно з показниками групи інтактних тварин [7] (рис. 2).

У групі мишей з АФС спостерігали підвищення концентрації фібриногену на 21 % порівняно з аналогічними показниками інтактних тварин.

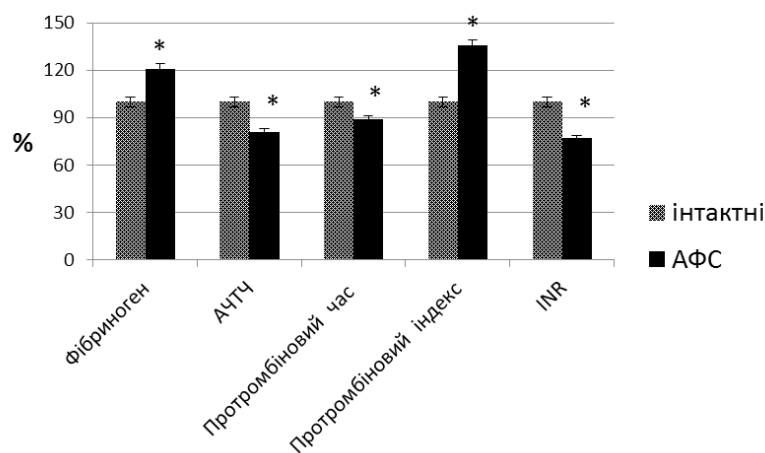


Рис. 2. Показники згортання крові в мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому (n=10).

У результаті проведених досліджень встановлено, що у групі мишей з АФС знижувався протромбіновий час на 21 % порівняно з інтактними тваринами. Спостерігали підвищення протромбінового часу на 21 % порівняно з показниками тварин 1-ї групи. Водночас встановлено зменшення на 23 % міжнародного нормалізованого співвідношення (INR) у тварин з АФС. Отже, укорочення протромбінового часу, подовження протромбінового індексу та зниження міжнародного нормалізованого співвідношення

свідчать про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення в самок з антифосфоліпідним синдромом, що є одним із провідних патогенетичних моментів невиношування вагітності при цій патології [3, 7, 8].

ВИСНОВОК. У мишей-самок лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом встановлено схильність до гіперкоагуляції та ризик тромбоутворення, що є одним із провідних механізмів патогенезу ускладнень при цій патології.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горницкая О. В. Антифосфолипидный синдром / О. В. Горницкая // Эксперим. та клініч. фізіологія та біохімія. – 2008. – № 1 (4). – С. 61–70.
2. Клюквина Н. Г. Антифосфолипидный синдром / Н. Г. Клюквина // Медицина неотложных состояний. – 2007. – № 1 (8). – С. 17–21.
3. Насонов Е. Л. Антифосфолипидный синдром / Е. Л. Насонов. – М. : Литтерра, 2004. – 440 с.
4. Острякова Е. В. Антифосфолипидный синдром и система фибринолиза / Е. В. Острякова, Л. И. Патрушев, Т. М. Решетняк // Науч.-практ. ревматология. – 2011. – № 6. – С. 57–64.

5. Посохова К. А. Акушерський антифосфоліпідний синдром і система оксиду азоту (огляд літератури і результати власних досліджень) / К. А. Посохова, І. Ю. Сак, С. Р. Сампара // Мед. хімія. – 2014. – **16**, № 1 (58). – С. 73–80.

6. Прокопюк В. Ю. Экспериментальная оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения антифосфолипидного синдрома / В. Ю. Прокопюк // Клініч. та експерим. патологія. – 2011. – **10**, № 2 (36), ч. 1. – С. 79–83.

7. Рогожина И. Е. Малоинвазивные технологии и система гемостаза при миоме матки / И. Е. Рогожина // Саратов. науч.-мед. журн. – 2011. – **7**, № 3. – С. 587–592.

8. Характеристика параметров свертывания крови при антифосфолипидном синдроме / Ф. Т. Халимова, А. В. Гулин, Е. В. Малышева [и др.] // Вестн. ТГУ. – 2012. – **17**, вып. 5. – С. 1449–1451.

9. Granakopoulos B. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome / B. Granakopoulos, S. Krilis // The New England Journal of Medicine. – 2013. – **368**. – P. 1033–1044.

10. Krone K. A. Impaired Fibrinolysis in the Antiphospholipid Syndrome / K. A. Krone, K. L. Allen, K. R. McCrae // Curr. Rheumatol. Rep. – 2010. – **12** (1). – P. 53–57.

11. Thrombocytopenia in the antiphospholipid syndrome / M. J. Cuadrado, F. Mujic, E. Muñoz [et al.] // Annals of the Rheumatic Diseases. – 1997. – **56**. – P. 194–196.

12. The role of antiphospholipid and antiplatelet antibodies in platelet dysfunction: computer-aided visualization / I. Vasilenko, I. Kastrikina, V. Metelin, T. Reshetnyak // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2009. – **7**, Suppl. 2. – PPWE 062.

О. З. Яремчук

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГЕМОСТАЗА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АНТИФОСФОЛИПИДНОМ СИНДРОМЕ

Резюме

Исследованы изменения показателей системы свертывания крови и уровень тромбоцитов в условиях экспериментального антифосфолипидного синдрома, который моделировали на мышах-самках линии BALB/c. В результате проведенных исследований в группе животных с этим синдромом установлено уменьшение количества тромбоцитов, укорочение протромбинового времени, увеличение протромбинового индекса и снижение международного нормализованного соотношения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антифосфолипидный синдром, антифосфолипидные антитела, гемостаз.

O. Z. Yaremchuk

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

RESEARCH OF HEMOSTASIS IN EXPERIMENTAL ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

Summary

This study investigated changes of indicators in blood coagulation system and platelet levels in experimental antiphospholipid syndrome (APS), which was modeled in female mice of the line BALB/c. The results show that the study group of the animals with APS reduced number of platelets, reduced prothrombin time, increase of prothrombin index and decrease of international normalized ratio.

KEY WORDS: antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, hemostasis.

Отримано 15.05.15

Адреса для листування: О. З. Яремчук, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.