

**ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ ТРОМБОЦИТІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ СИСТЕМНОГО ЧЕРВОНОГО ВОВЧАКА**

*Показано, що за системного червоного вовчака у хворих змінюється чутливість тромбоцитів до АДФ та колагену, зростають активність та концентрація PAI-1 у плазмі крові. Встановлено, що загальна фракція імуноглобулінів класу G, виділених із сироватки крові хворих на системний червоний вовчак, викликає підвищену секрецію PAI-1 з тромбоцитів шурів та зміну якісного і кількісного складу інгібітора.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** тромбоцити, системний червоний вовчак, інгібітор активаторів плазміногена 1 типу.

**ВСТУП.** Системний червоний вовчак (СЧВ) являє собою хронічну запальну хворобу, яка має численні прояви та перебігає з постійними рецидивами. Вона характеризується автоімунною відповіддю на власні ядерні та цитоплазматичні антигени. Системний червоний вовчак впливає на всі органи та системи організму, але перш за все порушується функціонування нирок, нервової системи та системи гемостазу [2, 4, 12]. Існує тісний взаємозв'язок між тромбоутворенням та запаленням – запалення призводить до активації коагуляції, що, у свою чергу, сприяє розвитку запальних процесів [7, 9]. Патологічне тромбоутворення є вагомим ускладненням за цієї патології, і ризик тромбозу у хворих значно вищий, ніж у загальній популяції [10, 11]. Тромбоцити відіграють ключову роль у тромбогенезі та є основним джерелом інгібітора активаторів плазміногена 1 типу (PAI-1). Висока концентрація PAI-1 інгібує фібриноліз та сприяє подальшому розвитку тромбозу [3, 8]. Тому метою даної роботи було комплексне дослідження стану тромбоцитів за системного червоного вовчака.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Аналіз агрегації тромбоцитів проводили на базі Українського державного НДІ реабілітації інвалідів МОЗ України. Процес агрегації тромбоцитів досліджували на фотооптичному агрегометрі AP2110 "Солар" (Білорусь). Кров для дослідження отримували з ліктьової вени широкою голкою в пластикові пробірки з антикоагулянтом 3,8 % цитратом натрію у співвідношенні 9:1 з 8 до 9 год ранку натщесерце. Багату та бідну на тромбоцити плазму крові для дослі-

© Т. Б. Вовк, Н. К. Бурлова-Васильєва, Л. І. Остапченко, 2012.

дження агрегації тромбоцитів одержували шляхом центрифугування за 160 і 250 g відповідно. Агрегацію тромбоцитів досліджували впродовж перших 2 год після забору крові. Як індуктор агрегації використовували АДФ та колаген. Робочі розведення реактиву готували безпосередньо перед дослідженням згідно з рекомендаціями фірми-виробника. Ступінь агрегації визначали як максимальний рівень світлопропускання плазми крові після внесення індуктора агрегації.

Вміст інгібітора активаторів плазміногена 1 типу в плазмі крові, збагаченій тромбоцитами (ПЗТ), та середовищі інкубації тромбоцитів визначали методом імуноферментного аналізу за стандартною методикою [6]. Активність інгібітора визначали за модифікованим методом [5].

Якісний та кількісний склад секреторних форм інгібітора вивчали методом вестерн-блотингу згідно з протоколом [13].

Обробку даних здійснювали за допомогою програм "TotalLab 2.01" (Amersham Biosciences) та "Statistica 6.0" (SPSS Inc.).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Для дослідження агрегації тромбоцитів використовували як індуктори агрегації АДФ та колаген. За розвитку СЧВ чутливість тромбоцитів до обох індукторів була підвищеною – на 20 та 10 % відповідно (табл. 1). Спонтанної агрегації у хворих не спостерігалось.

Аналіз вмісту та активності PAI-1 у плазмі крові хворих (n=250) показав значне підвищення активності та вмісту інгібітора порівняно з контрольною групою (n=65). Активність PAI-1 становила (83,1±11,3) ME t-PA/мл, тоді як контрольний показник складав (12,6±2,4) ME t-PA/мл. Вміст PAI-1 становив (49,7±3,8) та

Таблиця 1 – Ступінь агрегації тромбоцитів у здорових осіб та хворих на СЧВ

Група	Ступінь агрегації
АДФ 2,5 мкМ	
Контроль (n=30)	51,4±1,3
Хворі на СЧВ (n=40)	62,3±2,4*
Колаген 2 мг/мл	
Контроль (n=30)	78,5±1,2
Хворі на СЧВ (n=40)	87,8±1,1*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: \* – достовірні зміни порівняно з контролем (p<0,05).

(8,7±0,5) нг/мл у двох групах відповідно [1]. Таким чином, активність та пул інгібітора за СЧВ перевищували норму майже у 6 разів.

Для проведення подальших досліджень використовували модельну систему *in vitro*. Для цього отримували плазму крові, збагачену тромбоцитами, та чисті тромбоцити щурів. Із сироватки крові хворих на СЧВ хроматографічно виділяли загальну фракцію антитіл класу G (IgG СЧВ) та вивчали вплив IgG СЧВ на показники функціонування тромбоцитів (табл. 2). Як додаткове контрольне значення визначали вміст PAI-1 у бідній на тромбоцити плазмі щурів, де показник складав (18,2±1,4) нг/мл. У контрольний зразок ПЗТ додавали 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, з вмістом 130 мМ NaCl, який використовували для розведення IgG СЧВ. Зразки інкубували при 37 °С протягом 30 хв. За умов контролю концентрація PAI-1 у збагаченій тромбоцитами плазмі становила (41,2±5,6) нг/мл. При внесенні до зразка (IgG СЧВ) у кількості 1 мг/мл вміст інгібітора зростав до (91,3±11,2) нг/мл.

У контрольному середовищі інкубації тромбоцитів PAI-1 не було виявлено. Однак при внесенні до тромбоцитів антитіл класу G, виділених із сироватки хворих на СЧВ (IgG СЧВ), у кількості 0,5 та 1 мг/мл вміст PAI-1 становив (39,8±6,1) і (64,8±10,2) нг/мл відповідно.

Дослідження якісного та кількісного складу PAI-1 проводили методом вестерн-блотингу з використанням поліклональних антитіл до інгібітора. При аналізі блотограми у контрольному зразку було виявлено 3 комплексні форми інгібітора з молекулярними масами в межах 250, 200, 135 кДа (рис.). Спостерігалось незначне виділення вільної форми PAI-1 (смуга з молекулярною масою 56 кДа) та фрагмента інгібітора з молекулярною масою близько 30 кДа.

Таблиця 2 – Вміст інгібітора активаторів плазміногена у ПЗТ та середовищі інкубації тромбоцитів щурів

Об'єкт дослідження	Без IgG СЧВ, нг/мл	При додаванні 0,5 мг/мл IgG СЧВ, нг/мл	При додаванні 1 мг/мл IgG СЧВ, нг/мл
ПЗТ	41,2±5,6	59±8,7	91,3±11,2*
Тромбоцити	0	39,8±6,1*	64,8±10,2*
Плазма крові	18,2±1,4		

При внесенні до зразка IgG СЧВ у кількості 0,5 мг/мл чітко виявлялися 3 комплексні форми інгібітора з молекулярними масами в межах 340, 300 та 130 кДа. Значно посилювалося розщеплення інгібітора – на блотограми чітко видно 4 його фрагменти.

При збільшенні концентрації IgG СЧВ до 1 мг/мл спостерігалася поява ще 2-х комплексних форм PAI-1 з молекулярними масами в межах 200 та 100 кДа. При цьому зменшувався вміст вільної форми PAI-1, ймовірно, за рахунок комплексоутворення.

Внаслідок впливу IgG СЧВ основна маса інгібітора секретується у вільній формі, на яку припадає близько 40 % загального пулу, та в комплексній формі з молекулярною масою 130 кДа, на яку також припадає близько 40 % загального пулу PAI-1. Близько 10 % PAI-1 розщеплюється.

**ВИСНОВКИ.** Показано, що у групі хворих на СЧВ чутливість тромбоцитів до АДФ та колагену підвищена на 20 та 10 % відповідно. Спонтанної агрегації у хворих не спостерігається. Вміст PAI-1, а отже, і ступінь активації тромбоцитів прямо пропорційно залежить від концентрації антитіл класу G, наявних у крові хворих на СЧВ. Антитіла у концентрації 1 мг/мл спричиняють зростання вмісту PAI-1 у ПЗТ більше ніж у 2 рази. Інгібітор вивільнюється з тромбоцитів у різних комплексних формах, при цьому значно зростає його фрагментація.



Рис. Блотограма середовища інкубації тромбоцитів щурів з IgG СЧВ: 1 – маркери молекулярної маси, кДа; 2 – середовище інкубації тромбоцитів; 3 – середовище інкубації тромбоцитів з IgG СЧВ у кількості 0,5 мг/мл; 4 – середовище інкубації тромбоцитів з IgG СЧВ у кількості 1 мг/мл.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Характеристика фибринолитического потенциала плазмы крови при системной красной волчанке / М. С. Дармостук, А. Н. Савчук, Н. К. Бурлова-Васильева [и др.] // Лаб. діагностика. – 2010. – **52**, № 2. – С. 15–19.
2. Aringer M. Systemic lupus erythematosus / M. Aringer, F. Hiepe // Rheumatol. – 2011. – **70**, № 4. – P. 313–323.
3. Distribution of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in tissues / A. Simpson, N. Booth, N. Moore, B. Bennett // J. Clin. Pathol. – 1991. – **44**. – P. 139–143.
4. Doruk Erkan. Lupus and thrombosis / E. Doruk // J. Rheumatol. – 2006. – **33**. – P. 1715–1717.
5. Eriksson E. Determination of plasminogen activator inhibitor in plasma using t-PA and a chromogenic single-point poly-D-lysine stimulated assay / E. Eriksson, M. Ranby, E. Gyzander // Thromb. Res. – 1988. – **50**. – P. 91–101.
6. Harlow E. Antibodies / E. Harlow, D. Lane. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. – 726 p.
7. Kleinert S. Systemic lupus erythematosus. A problem based approach / S. Kleinert, M. Feuchtenberger, H. P. Tony // Internist (Berl). – 2010. – **51**, № 8. – P. 1013–1026.
8. Korte E. A. Contributions of mass spectrometry-based proteomics to defining cellular mechanisms and diagnostic markers for systemic lupus erythematosus / E. A. Korte, P. M. Gaffney, D. W. Powell // Arthritis Res Ther. – 2012. – **14**, № 1. – P. 204.
9. Levi M. Bidirectional relation between inflammation and coagulation / M. Levi, T. Poll, H. R. Buller // Circulation. – 2004. – **109**. – P. 2698–2704.
10. Lupus anticoagulant: An analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases / D. A. Gastineau, F. J. Kazmier, W. L. Nichols, W. Bowie // Am. J. Hematol. – 1985. – **19**, № 3. – P. 265–275.
11. Lupus anticoagulants are stronger risk factors or thrombosis than anticardiolipin antibodies in the antiphospholipid syndrome: a systematic review of the literature / M. Galli, D. Luciani, G. Bertolini and T. Barbui // Blood. – 2003. – **101**. – P. 1827–1832.
12. Platelets retain high levels of active plasminogen activator inhibitor 1 / H. Brogren, K. Wallmark, J. Deinum [et al.] // PLoS One. – 2011. – **6**, № 11. – P. 1–7.
13. Selected methods for antibody and nucleic acid probes. – USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. – 680 p.

**Т. Б. Вовк, Н. К. Бурлова-Васильева, Л. И. Остапченко**  
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

## ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКЕ

### Резюме

Показано, что при системной красной волчанке изменяется чувствительность тромбоцитов к АДФ и колагену, возрастают активность и концентрация PAI-1 в плазме крови. Установлено, что общая фракция иммуноглобулинов класса G, выделенных из сыворотки крови больных системной красной волчанкой, вызывает повышенную секрецию PAI-1 из тромбоцитов крыс и изменение качественного и количественного состава ингибитора.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** тромбоциты, системная красная волчанка, ингибитор активаторов плазминогена 1 типа.

**T. B. Vovk, N. K. Burlova-Vasylieva, L. I. Ostapchenko**  
KYIV TARAS SHEVCHENKO NATIONAL UNIVERSITY

## ASPECTS OF PLATELET BEHAVIOR UNDER SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

### Summary

Alterations of cell sensitivity to ADP and collagen and elevation of PAI-1 activity and content were detected in patients with systemic lupus erythematosus. It was shown that IgG purified from blood plasma of patients with systemic lupus erythematosus caused the elevation of PAI-1 secretion from platelets and alterations of qualitative and quantitative composition of the inhibitor.

**KEY WORDS:** platelets, systemic lupus erythematosus, type 1 plasminogen activator inhibitor.

Отримано 23.04.12

Адреса для листування: Т. Б. Вовк, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна, e-mail: burlova@mail.ru.