

**ВПЛИВ Ig G СИРОВАТКИ КРОВІ ХВОРИХ НА СИСТЕМНИЙ ЧЕРВОНИЙ
ВОВЧАК НА ПОТЕНЦІЙНУ АКТИВНІСТЬ АНТИТРОМБІНУ III
ТА ПЛАЗМІНОГЕНА**

Показано, що Ig G, які утворюються в плазмі крові при системному червоному вовчаку, не впливають на активацію антитромбіну III. Активація плазміногена стрептокіназою і тканинним активатором за присутності Ig G хворих на системний червоний вовчак також не порушується.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: системний червоний вовчак, антитромбін III, плазміноген.

ВСТУП. Аутоімунні захворювання зустрічаються у 3–5 % населення [6] і є результатом поєднання генетичних та екологічних факторів, які призводять до порушення імунної функції організму [7, 9]. Зміни в імунній системі, ініційовані втратою імунологічної толерантності до власних антигенів, спричиняють утворення аутоантитіл, які можуть бути виявлені у периферичній крові. Визначення конкретних медіаторів, які можуть викликати розвиток або сприяти прогресуванню аутоімунних захворювань, залишається у фокусі інтенсивних досліджень. Розвиток системного червоного вовчака (СЧВ) тісно пов'язаний з порушенням функціонування системи гемостазу [4]. Тромбоз є відомим клінічним проявом за цього захворювання. Найбільш важливим фактором ризику вважають наявність у плазмі крові антифосфоліпідних антитіл (APLAs). Проте близько 40 % дорослих із СЧВ, які є негативними за APLAs, мають діагноз тромбозу, що вказує на важливість інших факторів ризику. Серед таких факторів значну увагу приділяють розвиткові запальних процесів та дефіциту протеїнів С та S, антитромбіну [3]. У зв'язку з цим, було досліджено вплив Ig G сироватки крові хворих на системний червоний вовчак на ключові фактори системи згортання крові – антитромбін III та плазміноген. З метою виявлення ключових показників стану системи гемостазу за системного червоного вовчака проведено кореляційні дослідження даних хронометричних тестів та активності протеїну С, тканинного

активатора плазміногена та його основного фізіологічного інгібітора – PAI-1.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Активність антитромбіну III визначали в плазмі крові донорів. У лунках мікропланшета складали суміш загальним об'ємом 250 мкл, яка містила такі компоненти: 5 мкл плазми крові донорів, 30 мкг антитіл, 10 од. тромбіну, 25 мкл 2,5 мМ хромогенного субстрату протромбіну S_{2238} та 0,05 М Tris-HCl буфер, рН 7,4, що містив 0,13 М NaCl. Спонтанну активність препаратів перевіряли в системі, що не містила тромбіну. Суміш інкубували при температурі 37 °С. Рівень активності антитромбіну III реєстрували спектрофотометрично за розщепленням хромогенного субстрату тромбіну S_{2238} при довжині хвилі 405 нм на рідері-спектрофотометрі BioTek Instruments, Inc.

Активували плазміноген стрептокіназою в лунках мікропланшета. Реакційна суміш містила 1,2 к.о./мл Глу-Пг, 10 МО/мл стрептокінази, 150 мкг Ig G, 0,3 мМ S_{2251} та 0,05 М фосфатний буфер, рН 7,4. Об'єм реакційної суміші становив 250 мкл. Як контроль використовували аналогічну суміш, але без вмісту Ig G хворих на СЧВ. Інкубацію проводили при 37 °С. Ступінь активації плазміногена визначали за розщепленням хромогенного субстрату S_{2251} . Вимірювали зміну поглинання при 405 і 492 нм та будували криві залежності зміни поглинання за 405 нм від часу інкубації проб.

Активували плазміноген тканинним активатором аналогічно у суміші, яка містила 1,2 к.о./мл Глу-Пг, 10 МО/мл ТАП, 150 мкг Ig G,

0,3 мМ S_{2251} , 2 мкМ FCB-2 та 0,05 М фосфатний буфер, рН 7,4 до об'єму 250 мкл.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У системі згортання крові одним із ключових факторів є тромбін, який виконує специфічні протеолітичні та гормоноподібні функції. Він впливає на всі три ланки системи гемостазу, і регуляція його активації є важливим процесом підтримання гомеостазу [8]. Антитромбін III – основний антагоніст тромбіну, на який припадає 75 % всієї антикоагулянтної активності плазми. Він інактивує фактори IXa, Xa, XIa, XIIa, калікреїн та власне сам тромбін [5]. У літературі останніх років зустрічаються дані щодо впливу розвитку хвороби на процес активації протромбіну ендо- та екзогенним активаторами [2]. Проте не проаналізовано вплив аутоантитіл сироватки крові хворих на функціонування тромбін-антитромбінової системи.

За відсутності гепарину антитромбін III повільно і незворотно інгібує тромбін та інші фактори. За присутності гепарину антитромбін III набуває здатності швидко інгібувати дані ферменти. Згідно з цими міркуваннями, ми застосували модельну систему *in vitro*, яка містила гепарин, плазму крові донора з антитромбіном III та індивідуальні фракції Ig G хворих на СЧВ. Раніше було показано, що індивідуальний вміст Ig G у пацієнтів значно відрізняється [1]. Це дає змогу припустити, що специфічність цих Ig G також може значно варіювати у різних хворих. Тому при дослідженні впливу антитіл, які утворюються за розвитку СЧВ, на антитромбін III ми використовували індивідуальні фракції антитіл хворого.

Активність антитромбіну III ми визначали в плазмі крові донорів з використанням препарату чистого тромбіну. Як видно з рисунка 1, чистий тромбін швидко розщеплює хромогенний субстрат (крива "Тромбін"). Додавання плазми крові донорів з антитромбіном III

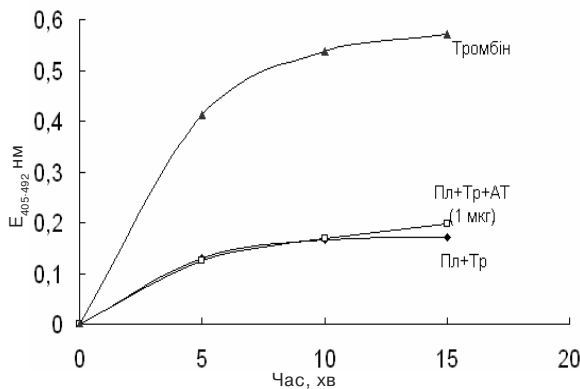


Рис. 1. Вплив антитіл хворого А на активність тромбіну в плазмі крові з антитромбіном III.

ефективно знижує активність тромбіну (крива "Пл+Тр"). Однак додавання антитіл хворого А у фізіологічних концентраціях в плазму крові донорів не впливає на інгібування антитромбіном III тромбіну (крива "Пл+Тр+АТ").

Отриманий результат свідчить про те, що у фракції Ig G хворого А не виявлено антитіл до антитромбіну III і антикоагулянтна активність плазми на рівні цього білка не порушується. Для проведення наступних дослідів ми використали аналогічну модельну систему, але з додаванням загальної фракції Ig G, виділених із плазми крові хворих на СЧВ. Змін активності антитромбіну III також не було виявлено. Таким чином, встановлено, що антитіла, що накопичуються в кровотоці хворих на СЧВ, не впливають на антикоагулянтну функцію антитромбіну III в плазмі крові.

На наступному етапі роботи досліджували вплив загальної фракції антитіл хворих на СЧВ на активацію плазміногена екзо- та ендоактиваторами. Плазміноген є неактивним попередником ферменту плазміну і показником стану фібринолітичної системи крові. Він характеризує здатність системи гемостазу вчасно розчиняти новоутворені фібринові згустки [10]. Як видно з рисунка 2, Ig G хворих на СЧВ не спричиняють значних змін процесу активації плазміногена за присутності стрептокінази. Криві дослідів та контролю практично збігаються.

Також проводили дослідження активації плазміногена його фізіологічним активатором – тканинним активатором плазміногена (t-PA) під дією Ig G хворих на СЧВ (рис. 3). На рисунку наведено залежність швидкості активації плазміногена від присутності Ig G хворих

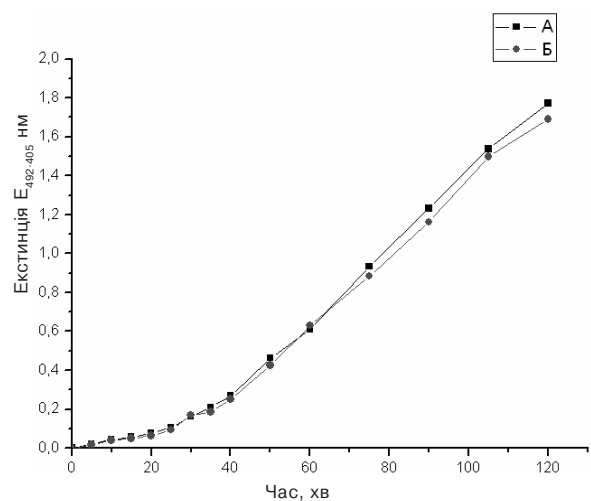


Рис. 2. Активация плазміногена стрептокіназою.

Примітка. А – контроль; Б – під впливом Ig G хворих на СЧВ.

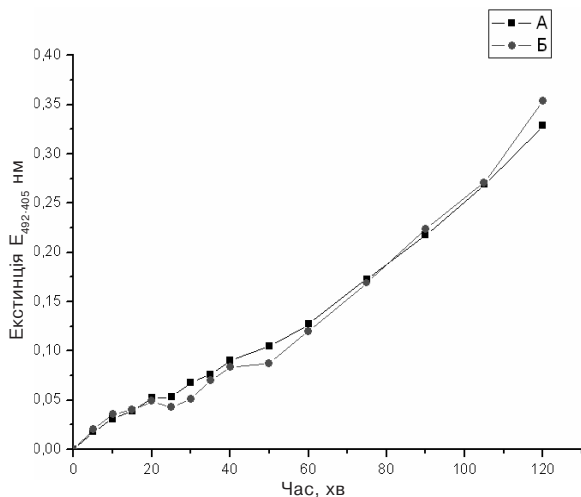


Рис. 3. Активація плазміногена тканинним активатором.

Примітка. А – контроль; Б – під впливом Ig G хворих на СЧВ.

на СЧВ. Криві контролю та досліджу не мають статистично значущих відмінностей. Таким чином, отримані дані дозволяють нам стверджу-

вати, що активація плазміногена за розвитку СЧВ не порушується, тобто у фракції Ig G сироватки крові хворих на системний червоний вовчак відсутні антитіла як до плазміногена, так і до тканинного активатора плазміногена.

ВИСНОВКИ. Показано, що Ig G сироватки крові хворих на системний червоний вовчак не впливають на процес активації антитромбіну III. Такий результат свідчить про відсутність у фракції імуноглобулінів антитіл до даного фактора. Дослідження активації плазміногена екзогенним активатором стрептокіназою та основним фізіологічним активатором – t-PA не виявили відмінностей процесу в контрольних зразках та за присутності Ig G сироватки крові хворих на системний червоний вовчак. Застосування двох активаторів, різних за природою дії, дає змогу стверджувати, що за розвитку СЧВ не порушується активація даного проферменту, тобто в дослідженій фракції імуноглобулінів немає антитіл до тканинного активатора плазміногена та до самого плазміногена.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вовк Т. Б. Аутоімунні антитіла до ключових компонентів системи зсідання крові, які утворилися в кровотоці при системному червоному вовчаку / Т. Б. Вовк, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко // Фізика живого. – 2010. – **18**, № 3. – С. 59–63.
2. Шевчук С. В. Комплексна діагностика тромбофілії за системного червоного вовчака / С. В. Шевчук, О. В. Горницька, Т. М. Чернищенко // Лаб. діагностика. – 2010. – **1**, № 51. – Р. 3–7.
3. Al-Homood I. A. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: a review article / I. A. Al-Homood // ISRN Rheumatol. – 2012. – Р. 428–269.
4. Aringer M. Systemic lupus erythematosus / M. Aringer, F. Hiepe // Rheumatol. – 2011. – **70**, № 4. – Р. 313–323.
5. Blajchman M. A. An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states / M. A. Blajchman // Blood. Coagul. And Fibrinol. – 1994. – **5**. – Р. 5–11.
6. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States / D. L. Jacobson, S. J. Gange, N. R. Rose, N. M. H. Graham // Clinical Immunology and Immunopathology. – 1997. – **84**, № 3. – Р. 223–243.
7. Marrack P. Autoimmune disease: why and where it occurs / P. Marrack, J. Kappler, B. L. Kotzin // Nature Medicine. – 2001. – **7**, № 8. – Р. 899–905.
8. Nesheim M. Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis / M. Nesheim, M. Wang, M. B. Boffa // Thromb. Haemost. – 1997. – **78**. – Р. 386–391.
9. Salaman M. R. / A two-step hypothesis for the appearance of autoimmune disease / M. R. Salaman // Autoimmunity. – 2003. – **36**, № 2. – Р. 57–61.
10. Wallen P. Characterization of human plasminogen / P. Wallen, B. Wiman // Biochem. et Biophys. Acta. – 1970. – **221**. – Р. 20–30.

Т. Б. Вовк, Н. К. Кравченко, Л. И. Остапченко
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ВЛИЯНИЕ Ig G СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ СИСТЕМОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ НА ПОТЕНЦИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АНТИТРОМБИНА III И ПЛАЗМИНОГЕНА

Резюме

Показано, что Ig G, образующиеся в плазме крови при системной красной волчанке, не влияют на активацию антитромбина III. Активация плазминогена стрептокиназой и тканевым активатором в присутствии Ig G больных системной красной волчанкой также не нарушается.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: системная красная волчанка, антитромбин III, плазминоген.

T. B. Vovk, N. K. Kravchenko, L. I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

INVESTIGATION OF THE SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS SERUM Ig G EFFECT ON THE ACTIVATION OF ANTITHROMBIN III AND PLASMINOGEN

Summary

It was shown that Ig G formed in blood plasma of patients with systemic lupus erythematosus had no effect on the activation of antithrombin III. Activation of plasminogen by streptokinase and tissue-type activator in the presence of systemic lupus erythematosus serum Ig G also was not affected.

KEY WORDS: systemic lupus erythematosus, antithrombin III, plasminogen.

Отримано 23.11.12

Адреса для листування: Н. К. Кравченко, вул. Володимирська, 64, кв. 13, Київ, 01601, Україна, e-mail: burlova@mail.ru.