

ВПЛИВ Ig G ХВОРИХ НА СИСТЕМНИЙ ЧЕРВОНИЙ ВОВЧАК НА ПОКАЗНИКИ ХРОНОМЕТРИЧНИХ ТЕСТІВ

Із сироваток крові хворих на системний червоний вовчак виділено антитіла класу Ig G. Показано, що загальний пул Ig G містить автоантитіла до протромбіну та пролонгує показники таких хронометричних тестів, як “екамуліновий час”, “протромбіновий час” та “активований частковий тромбластиновий час”.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: системний червоний вовчак, екамуліновий час, протромбіновий час, активований частковий тромбластиновий час.

ВСТУП. Одним з основних клінічних симптомів за системного червоного вовчака (СЧВ) є артеріальні та венозні тромбози, ризик розвитку яких збільшується до 60–70 % в разі виявлення у крові антифосфоліпідних антитіл [4, 5]. Механізмом розвитку СЧВ є поліклональна активація В-лімфоцитів і продукція автоантитіл, які зумовлюють ураження практично всіх тканин та органів, у результаті чого захворювання набуває полісистемного характеру [8]. Основний патологічний вплив на организм мають імуноглобуліни класу Ig G, які проявляють цитотоксичну, імунокомплексну та протромботичну дії [7]. У зв'язку з цим, дослідження впливу автоантитіл на параметри системи гемостазу може розширити розуміння симптоматики системного червоного вовчака і зробити внесок у розвиток системи діагностики та лікування даного захворювання.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для виділення фракції Ig G із сироватки крові хворих на системний червоний вовчак (n=38) на колонку з протеїн А-сефарозою наносили 1 мл сироватки крові (загальний об'єм колонки – 1,5 мл). Відмивали неспецифічно зв'язані білки десятима об'ємами колонки (15 мл), 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4. Елюцію проводили гліциновим буфером (0,1 М гліцин-НСІ, рН 2,2). Фракції збирали по 1 мл та вимірювали оптичну густина отриманих антитіл. Проби, які містили білок, об'єднували та висолювали розчином сульфату амонію до кінцевої концентрації 50 % і при температурі 4 °С залишали на ніч. Центрифугували при 3000 об./хв упродовж 30 хв, супернатант відкидали, а осад розчиняли в

1 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, рН 7,4 [6]. Для отримання окремої фракції антитіл до протромбіну використовували синтезовану колонку – протромбін-сефарозу. Усі маніпуляції з виділення антитіл до протромбіну проводили аналогічно отриманню загальної фракції антитіл класу Ig G на колонці з протеїн А-сефарозою.

Для позбавлення від залишків амонію розчин антитіл наносили на колонку G 25, врівноважену 0,05 М Na-фосфатним буфером, рН 7,4 (загальний об'єм колонки – 8,3 мл). Фракції збирали по 1 мл і вимірювали концентрацію антитіл при 280 нм. Проби, які містили білок, об'єднували, концентрували, вимірювали оптичну густина і перераховували на концентрацію отриманих антитіл. Зберігали за температури -20 °С.

Для проведення тесту “екамуліновий час” у скляну конічну пробірку вносили 100 мкл 0,025 М CaCl₂; 10 мкл розчину екамуліну, кількість якого становила 1,3·10⁻⁵ екамулінових одиниць; 90 мкл 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,4, що містив 0,13 М NaCl; 100 мкл досліджуваної плазми. Ретельно перемішували і визначали час згортання крові, помірно струшуючи пробірку у водяній бані за температури 37 °С. За екамулінову одиницю брали кількість ферменту в 1 мл розчину, що згортає рівний об'єм плазми, яка розбавлена 1:1, за (20±2) с при 37 °С [3].

Для проведення тесту “протромбіновий час” у скляну конічну пробірку вносили 100 мкл досліджуваної плазми крові та прогрівали 1 хв за температури 37 °С на водяній бані. Після цього додавали 200 мкл тромбластину з 12,5 мМ розчином хлориду кальцію і визна-

чали час згортання плазми крові, помірно струшуючи пробірку у водяній бані за температури 37 °С [1].

Для проведення тесту “активованій частковий тромбопластиновий час” готували суміш, яка містила 0,1 мл плазми крові, 0,1 мл АЧТЧ-реагенту, й інкубували протягом 3 хв за температури 37 °С, потім додавали 0,1 мл 25 мМ CaCl₂ та візуально визначали час згортання плазми крові [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для визначення впливу Ig G хворих на СЧВ на функціонування системи гемостазу було проведено ряд хронометричних тестів, які різносторонньо характеризують процес згортання крові. При цьому тестували як індивідуальні фракції Ig G окремих хворих, так і загальний пул Ig G, виділений із сироваток крові 38 пацієнтів. Даний підхід дозволив виявити як індивідуальні особливості перебігу процесів згортання, так і тенденції, загальні для всієї групи хворих.

Для тесту “екамуліновий час” використовували екамулін – фермент-активатор протромбіну, виділений з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatus*). Даний тест дозволяє виявити функціонально неактивні форми протромбіну, які є маркером тромбофілії, та здійснити контроль ефективності лікування антикоагулянтами непрямої дії. Тест “екамуліновий час” було проведено у плазмі крові донорів з додаванням індивідуальних фракцій антитіл різних хворих на СЧВ (n=5) (рис. 1). При цьому індивідуальні фракції вносили у систему тесту в різних концентраціях з метою виявлення можливої гетерогенності впливу антитіл кожного пацієнта на активацію протромбіну. Як видно з рисунка, наявність антитіл у системі впливає на процес активації

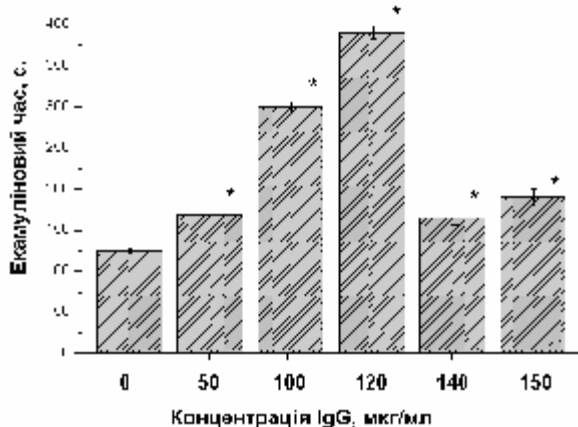


Рис. 1. Час згортання плазми крові донорів у тесті “екамуліновий час” при додаванні індивідуальних фракцій антитіл різних хворих на СЧВ (n=5) (* – відмінності достовірні відносно контролю, p<0,05).

протромбіну екамуліном і, відповідно, на швидкість утворення фібринового згустку. Проте реакція має чітко виражений індивідуальний характер. Відносно високі концентрації антитіл – 140 і 150 мкг/мл (хворі № 4 та № 5) викликали значно нижчий ефект, ніж менші концентрації фракцій Ig G, проте отримані від інших хворих. Одержаний результат дає змогу припустити, що досліджені фракції Ig G містять антитіла до протромбіну, які взаємодіють зі своєю мішенню і впливають на результат аналізу.

Наступний тест проводили, аналогічно попередньому, в плазмі крові донорів, в яку вносили різну кількість антитіл хворого № 3. На рисунку 2 наведено залежність показників тесту “екамуліновий час” від вмісту в системі тесту антитіл даного хворого. Як видно з рисунка, простежується чітко виражена концентраційна залежність активації протромбіну екзогенним активатором екамуліном від вмісту антитіл у системі тесту. Зі збільшенням концентрації антитіл зростає екамуліновий час згортання плазми крові, досягаючи 390 с, що перевищує контрольний показник у 3 рази.

Встановлені зміни активності протромбіну за присутності антитіл хворих на СЧВ можуть свідчити про наявність у загальному пулі Ig G антитіл до даного фактора згортання крові. Для перевірки даної гіпотези загальний пул Ig G хворих на СЧВ було очищено методом афінної хроматографії на протромбін-сефарозі (рис. 3). В ході хроматографічного розділення отримано фракцію антитіл до протромбіну з концентрацією 0,12 мг/мл.

Для проведення тестів “активованій частковий тромбопластиновий час” та “протромбіновий час” використовували загальний пул Ig G, виділений із сироваток крові хворих на

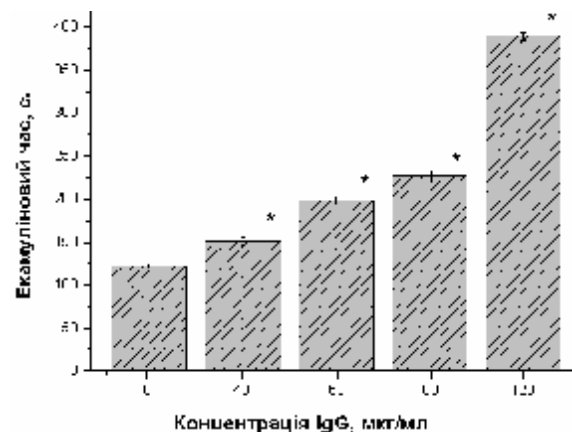


Рис. 2. Час згортання плазми крові донорів у тесті “екамуліновий час” залежно від концентрації антитіл хворого № 3 (* – відмінності достовірні відносно контролю, p<0,05).

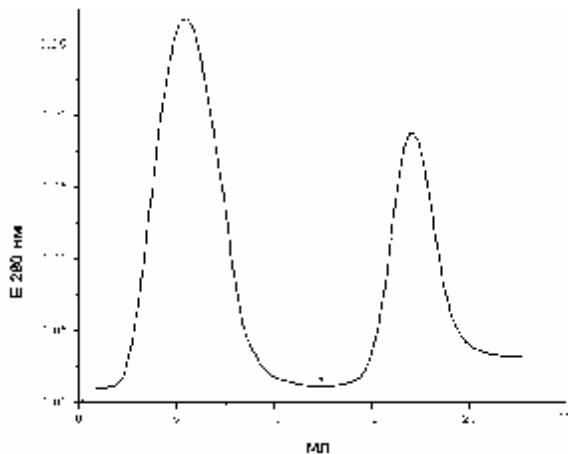


Рис. 3. Хроматограма виділення антитіл до протромбіну із загального пулу Ig G хворих на системний червоний вовчак на колонці з протромбін-сефарозою (стрілкою показано зміну 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,4, на елюючий буфер – 0,1 М гліцин-НСІ, рН 2,2).

СЧВ. Тест “активованій частковий тромбопластиновий час” імітує процес коагуляції за внутрішнім шляхом і дозволяє виявити дефіцит плазмових факторів (XII, XI, IX, VIII, X, V, II) або наявність у крові інгібіторів цих факторів та антикоагулянтів. При перерахованих патологіях спостерігали подовження часу згортання плазми крові у тесті. Було встановлено, що час згортання плазми крові донорів у тесті “активованій частковий тромбопластиновий час” зростає з підвищенням вмісту Ig G хворих у системі. Статистично достовірне збільшення часу згортання було отримано при внесенні 230 мкг/мл антитіл. Показник тесту складав $(62 \pm 7,2)$ с, що перевищувало контроль на 48 % (рис. 4).

Тест “протромбіновий час” характеризує зовнішній шлях згортання крові. Його використовують для оцінки печінкової функції (синтезу факторів коагуляції), ступеня насичення вітаміном К. Тест дозволяє оцінити активність факторів згортання I, II, V, VII та X. Було показано, що час згортання плазми крові донорів у тесті “протромбіновий час” також залежав від концентрації Ig G хворих у системі тесту. При додаванні 230 мкг/мл антитіл показник тесту збільшувався на 18 % відносно контролю (рис. 5).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баркаган З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – М. : Ньюдиамед, 2001. – 296 с.

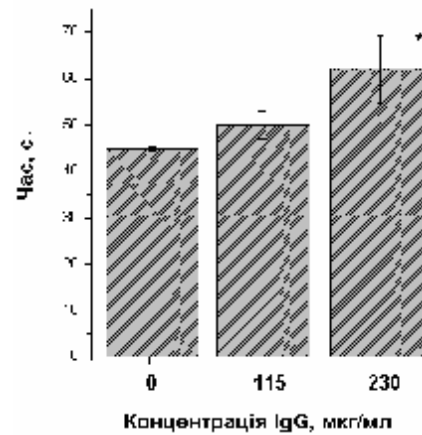


Рис. 4. Час згортання плазми крові донорів у тесті “активованій частковий тромбопластиновий час” залежно від концентрації Ig G хворих на СЧВ (* – відмінності достовірні відносно контролю, $p < 0,05$).

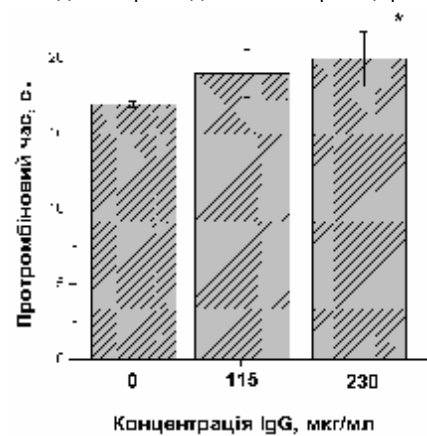


Рис. 5. Час згортання плазми крові донорів у тесті “протромбіновий час” залежно від концентрації Ig G хворих на системний червоний вовчак (* – відмінності достовірні відносно контролю, $p < 0,05$).

ВИСНОВКИ. Показано, що за системного червоного вовчак у плазмі крові хворих утворюються автоантитіла до протромбіну, які подовжують час згортання плазми крові у тесті “екамуліновий час”. Активація протромбіну, а отже, і концентрація антипротромбінових антитіл мають чітко виражений індивідуальний характер. Встановлено подовження часу згортання плазми крові донорів у тестах “протромбіновий час” та “активованій частковий тромбопластиновий час” за наявності у пробі Ig G хворих на системний червоний вовчак.

2. Долгов В. В. Лабораторная диагностика нарушенного гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов. – М. – Тверь : Триада, 2005. – 227 с.

3. Оценка информативности и прогностической значимости традиционных скрининговых и дополнительных лабораторных тестов для диагностики тромбофилии / Т. Н. Платонова, Н. В. Заичко, Т. М. Чернышенко [и др.] // Лаб. діагностика. – 2010. – **4**, 54. – С. 34–44.

4. Системний червоний вовчак: патогенетичні особливості клінічної симптоматики, сучасна діагностична і терапевтична тактики ведення хворих / В. М. Коваленко, Н. М. Шуба, О. П. Борткевич, Ю. В. Білявська // Укр. ревматол. журн. – 2010. – **39**, № 1. – С. 13–23.

5. Alarcon-Segovia D. Long-term prognosis of antiphospholipid syndrome in patients with systemic

lupus erythematosus / D. Alarcon-Segovia, A. Perez-Ruiz, A. R. Vila // J. Autoimmunity. – 2000. – **15**. – P. 157–163.

6. Huse K. Purification of antibodies by affinity chromatography / K. Huse, H. J. Bohme, G. H. Scholz // J. Biochem. Biophys. Methods. – 2002. – **51**(3). – P. 217–231.

7. Rahman A. Autoantibodies, lupus and the science of sabotage / A. Rahman // Rheumatology. – 2004. – **43**, № 11. – P. 1326–1336.

8. Thrombophilia and thrombosis in systemic lupus erythematosus: a case-control study / D. Barcat, V. Guerin, A. Ryman [et al.] // Ann Rheum Dis. – 2003. – **62**. – P. 1016–1017.

Т. Б. Вовк

КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ВЛИЯНИЕ Ig G БОЛЬНЫХ СИСТЕМОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ ХРОНОМЕТРИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

Резюме

Из сывороток крови больных системной красной волчанкой выделены антитела класса Ig G. Показано, что общий пул Ig G содержит аутоантитела к протромбину и пролонгирует показатели таких хронометрических тестов, как “экамулиновое время”, “протромбиновое время” и “активированное частичное тромбопластиновое время”.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: системная красная волчанка, экамулиновое время, протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время.

T. B. Vovk

TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

Ig G INFLUENCE OF PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ON INFLUENCE BLOOD CLOTTING TESTS

Summary

Ig G fraction was purified from the serum samples of patients with systemic lupus erythematosus. It was shown that the total Ig G fraction comprised autoantibodies to prothrombin and prolonged blood clotting time in such chronometric tests as “ekamulin time”, “prothrombin time” and “partial thromboplastin time”.

KEY WORDS: systemic lupus erythematosus, ekamulin time, prothrombin time, partial thromboplastin time.

Отримано 16.05.13

Адреса для листування: Т. Б. Вовк, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ “Інститут Біології”, вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна, e-mail: olexiy.savchuk@yandex.ru.