

На допомогу лікареві

УДК 616-005, 616.33

В.О.ЧЕРНИШЕНКО^{1,2}, Я.С.МАКСИМОВИЧ¹, Д.С.КОРОЛЬОВА^{1,2},
Т.М.ПЛАТОНОВА², Л.І.ОСТАПЧЕНКО¹
bio.cherv@gmail.com

¹ Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,
² Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна, Київ

Зміни у плазмовому та тромбоцитарному гемостазі при гострій виразковій хворобі шлунка

Відомо, що виразка шлунка часто супроводжується розбалансуванням системи гемостазу. Зокрема, для хворих характерне, з одного боку, порушення антикоагулянтного потенціалу, а з іншого — активація системи зсідання крові внаслідок експонування тканинного фактора на uszkodжену ендотелію [1, 2, 13]. Своєчасне виявлення розвитку тромботичних ускладнень необхідне для правильної діагностики та добору методів лікування. З огляду на це особливого значення набуває дослідження механізмів регуляції системи гемостазу за цих патологій, особливо зв'язку плазмового та тромбоцитарного гемостазу.

Тромбоцити — перші клітини, що акумулюються біля ділянок uszkodження судини. Вони є багатим джерелом як про-, так і антиангіогенних факторів. Тромбопоетин, який виділяється активованими тромбоцитами, може сприяти виробленню фактора росту ендотелію з мегакаріоцитів. З іншого боку, ангіостатин, що також вивільняється з тромбоцитів, інгібує ангіогенез. Отже, тромбоцити є засобом доставки даних факторів до uszkodжених ділянок ендотелію [3]. Крім цього, фактор некрозу пухлин (TNF- α), який одним із перших цитокінів вивільняється з ендотеліоцитів у місці запалення, запускає реакції імунної відповіді та рекрутинг лейкоцитів, а також здатен індукувати адгезію тромбоцитів до ендотеліальних клітин, тому його поява у кровоплинні впливає на функціональний стан тромбоцитів, що необхідно враховувати за розвитку виразки шлунка [21, 22].

Крововиливи та уповільнення загоєння виразок, спричинених застосуванням протизапальних препаратів, можуть бути зумовлені інгібуванням агрегації тромбоцитів та порушенням вивільнення з тромбоцитів медіаторів, які відіграють важливу роль у відновленні ендотелію та загоєнні виразок, зокрема фактора росту ендотелію [17].

Показано, що загоєння виразки залежить від кількості та ступеня активації тромбоцитів, акумульованих у зоні запалення. Зокрема, інтактні тромбоцити мають більший загоювальний ефект, ніж тромбоцитарний лізат. Отже, характеристика стану тромбоцитарної ланки за умов виразкоутворення дає інформацію і про потенціал системи гемостазу, і про перебіг загоєння виразки шлунка [23].

Таким чином, надзвичайно важливо оцінити стан тромбоцитарної ланки системи гемостазу одночасно з визначенням параметрів плазмового гемостазу, особливо за умов патологій, пов'язаних з розвитком запальних процесів, ураженнями слизових оболонок та стінок судин. З огляду на це метою нашої роботи було визначення змін у тромбоцитарному та плазмовому гемостазі при гострій виразці шлунка у хворих та за умов експериментальної виразки шлунка щурів.

Матеріали і методи досліджень. *Модель виразки шлунка in vivo.* У досліджах дотримувалися міжнародних рекомендацій з проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з вимогами Європейської конвенції. У роботі використовували нелінійних білих щурів-самців масою 250–270 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Експериментальну виразку шлунка у піддослідних тварин утворювали за допомогою імобілізаційного водно-імерсійного стресу, за методом Takagi [21]. Тварин у перфорованих металічних патронах зі скляними вікнами в донній частині та отвором для хвоста щура, занурювали у воду при 23°C на 3 год, викликаючи ураження слизової оболонки шлунка.

Отримання плазми крові людини: плазму крові хворих ($n = 28$) на гостру виразкову хворобу шлунка з кровотечею середнього та тяжкого ступеня отримували пункцією ліктьової вени за стандартною методикою [9]. Обстеження хворих проводили після ускладнення кровотечею.

Плазму крові, збагачену на тромбоцити, отримували шляхом центрифугування цільної крові протягом 20 хв при 160 g і температурі 20°C. Для роботи відбирали і використовували надосадову рідину, яка містила тромбоцити.

Для вивчення АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів використовували плазму крові, збагачену тромбоцитами. Агрегацію тромбоцитів вивчали на агрегометрі "SOLAR AP2110".

Для отримання протромбіну проводили гідроліз протромбіну тромбіном, взятих у відношенні 1:1 у *trp*-HCl буфері із 0,13M NaCl, pH 7,4 впродовж 1,5 год при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли диізопропілфторфосфатом у кінцевій концентрації 1 мМ. Препарат протромбіну очищали шляхом йонообмінної хроматографії на *Q-Sepharose*, зрівноваженої 0,02 M *trp*-HCl буфером. Протромбін елюювали за йонної сили 0,4 M. Чистоту препарату контролювали за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за методом Лемлі [17].

Для визначення функціонально неактивних форм протромбіну (ФНФП) у плазмі крові проводили активацію протромбіну тромбопластином та екамуліном — ферментом з отрути ефі багатолускової (*Echis multisquamatis*). Екамулін, на відміну від тромбопластину, здатен активувати не тільки протромбін, але і його функціонально неактивну форму протромбін 1, який з'являється у кровоплинні під дією тромбіну і є маркером внутрішньосудинного мікрозсідання крові [6, 7, 11].

Процес активації протромбіну фіксували, визначаючи амідолітичну активність утвореного тромбіну за допомогою хромогенного субстрату S2238 (*Sigma* або *Chromogenix H-D-Phe-Pip-Arg-pNA*) відповідно до методу, який описаний в інструкції *Kabi Diagnostica*, Швеція.

Результати вимірювань в екамуліновому та тромбопластиновому тестах виражали у вигляді відношення амідолітичної активності плазми крові пацієнта та донора [6, 11]. Рівень функціонально-неактивних форм протромбіну визначали за різницею екамулінового та протромбінового відношення.

Визначення рівня розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК), маркерів активації системи зсідання крові, проводили згідно з методом Беліцера–Варецької [13, 14].

Лізис еуглобулінової фракції проводили таким чином: до 4 мл охолодженої (+2...+8°C) дистильованої води додавали 75 мкл 1% розчину оцтової кислоти та 250 мкл досліджуваної плазми крові. Суміш витримували при температурі +2...+8°C впродовж 30 хв та осаджували центрифугуванням за швидкості 230 g протягом 10 хв. Надосадову рідину зливали, пробірки висушували, перевертаючи на фільтрувальний папір. Осад еуглобулінів розчиняли в 250 мкл 0,05 M *trp*-HCl буфера pH 7,4 при температурі 37°C. Після додавання 250 мкл 0,025M CaCl₂ обережно перемішували. Суміш інкубували при 37°C. Час з мо-

менту додавання CaCl_2 до повного розчинення згустка в нормі становив 180–240 хв [9].

Амідолітичну активність протеїну С у плазмі крові визначали за допомогою активатора протеїну С, виділеного з отрути щитомордника звичайного *Agkistrodon halys halys* [10] з використанням хромогенного субстрату, при довжині хвилі 405–492 нм на спектрофотометрі для мікропланшетів згідно з інструкцією “Ренам”, Росія.

Результати досліджень та їх обговорення. Для вивчення стану системи гемостазу за умов виникнення абдомінальних кровотеч ми провели комплексне дослідження цієї системи у хворих на гостру виразку шлунка та використали експериментальну модель виразки шлунка у щурів з метою дослідження стану тромбоцитарної ланки гемостазу за даної патології.

Проведені комплексні дослідження стану системи гемостазу хворих на гостру виразкову хворобу шлунка показали, що пов’язані з нею патологічні зміни викликають розбалансування у системі протеїну С. Активність протеїну С у плазмі крові пацієнтів значно знижується (до 60–80%). Слід зауважити, що внаслідок порушення процесу зсідання крові визначення рівня протеїну С у коагуляційному тесті за даної патології часто дає завищені результати. З огляду на це необхідно визначати активність протеїну С з використанням хромогенних субстратів [4].

Таке зниження активності протеїну С поряд з накопиченням маркера тромбінемії — розчинних фібрин-мономерних комплексів (РФМК) можна розглядати як загрозу розвитку тромботичних ускладнень.

Накопичення РФМК свідчить про активацію системи зсідання крові, а отже, про появу у кровоплині тромбіну, що відщеплює від фібриногену фібринопептиди з утворенням здатного до комплексоутворення мономерного фібрину, який циркулює у кровоплині у складі комплексів з фібриногеном та продуктами плазмінової деградації фібриногену-фібрину (рис. 1) [13]. Сьогодні актуальним є пошук маркерів тромбінемії, що дозволили б точніше оцінити стан прокоагулянтної ланки гемостазу та визначити причину виникнення порушень за розвитку даної патології.

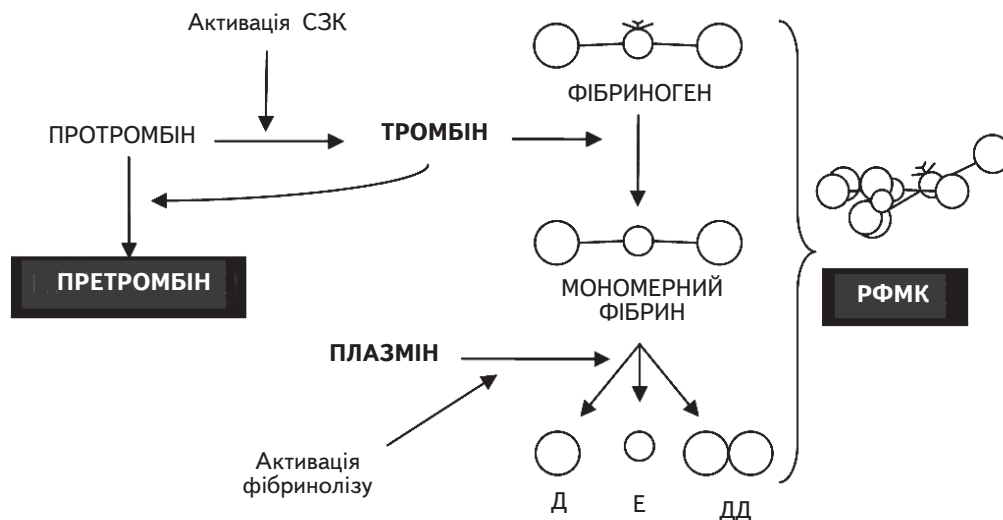


Рис. 1. Схема утворення маркерів активації системи зсідання крові — РФМК та претромбіну-1:

РФМК — розчинні фібрин-мономерні комплекси, до складу яких входять фрагменти фібриногену/фібрину (Д-, Е- та ДД-фрагменти);
СЗК — система зсідання крові

Одним із таких маркерів можуть бути функціонально неактивні форми протромбіну (ФНФП). До ФНФП належить насамперед претромбін, який утворюється внаслідок обмеженого протеолізу протромбіну тромбіном. Відщеплення N-кінцевої ділянки молекули протромбіну у процесі формування претромбіну сприяє формуванню в молекулі претромбіну проєкзосайту 1, що відповідає за зв'язування молекули з лігандами тромбіну, зокрема клітинними рецепторами тромбіну [19].

Показано, що у кровоплинні хворих на гостру виразкову хворобу шлунка з'являються РФМК (від 0,01 до 0,1 г/л) та ФНФП (від 0,3 до 2 мкг/мл), які в нормі відсутні. Окрім цього, суттєво подовжується час лізису еуглобулінової фракції — 342 ± 159 хв, тоді як норма становить 180–240 хв. Таким чином, комплексний аналіз стану системи гемостазу хворих виявив активацію системи зсідання крові, що супроводжується появою специфічних маркерів порушення балансу між протактикоагулянтною ланками системи зсідання крові, а також зниженням потенціалу системи фібринолізу.

Враховуючи значну роль даних маркерів дисбалансу в системі гемостазу, важливим є пошук їх зв'язку з тромбоцитарною ланкою гемостазу, що необхідно як для вивчення патогенезу захворювання, так і для прогнозування розвитку ускладнень. Показано, що накопичення РФМК у плазмі крові супроводжується прискоренням процесу агрегації тромбоцитів [5]. Водночас у присутності фрагментів фібриногену-фібрину, що входять до складу РФМК, виявлено зниження агрегації тромбоцитів, спорідненості фібриногену до тромбоцитів та експресії на тромбоцитах рецептора фібриногену GP IIb-IIIa [7, 15, 20].

З метою вивчення стану тромбоцитарної ланки системи гемостазу в перші години після виникнення виразки шлунка ми використали модель виразки шлунка щурів, за умов розвитку якої досліджували процес агрегації тромбоцитів у збагаченій тромбоцитами плазмі крові. Виявлено зниження швидкості АДФ-індукованої агрегації у 2 рази порівняно з контролем (рис. 2), при цьому час агрегації тромбоцитів у

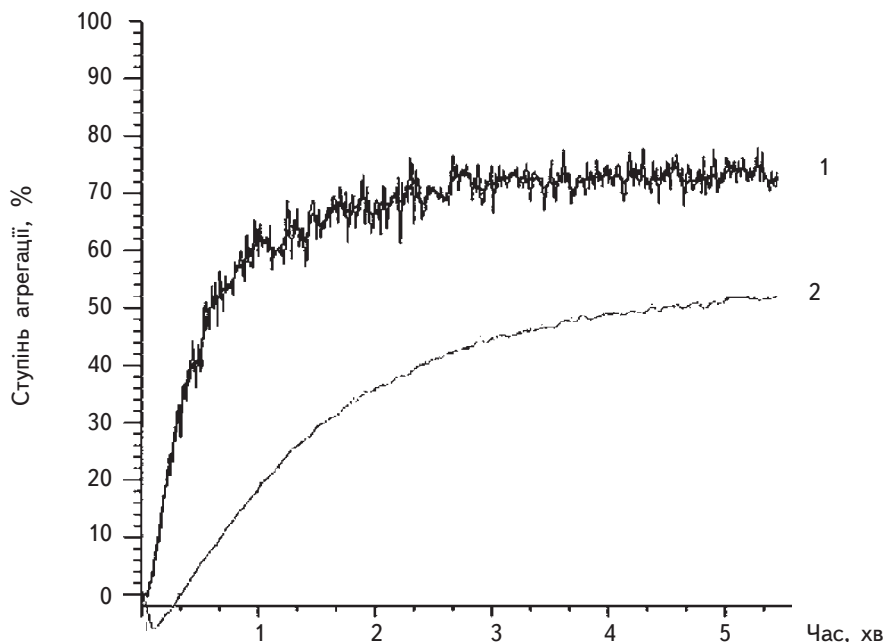


Рис. 2. АДФ-індукована агрегація тромбоцитів щурів у нормі (1) та за умов розвитку експериментальної моделі виразки шлунка (2).
(Агрегатограма типового експерименту)

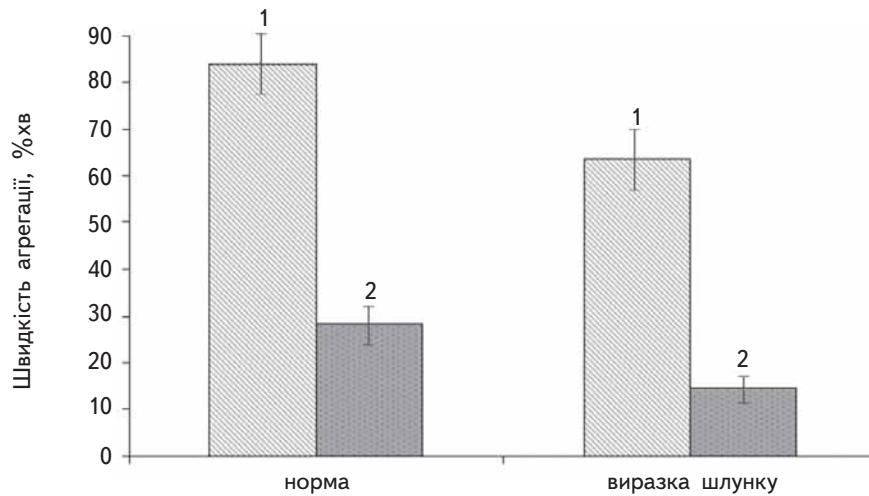


Рис. 3. АДФ-індукована агрегація тромбоцитів в нормі та за умов розвитку експериментальної моделі виразки шлунка:

1 — контроль;

2 — тромбоцити у присутності 0,28 мкМ претромбіну

модельній системі виразки подовжувався. Збільшення часу агрегації тромбоцитів за даної патології у щурів може пояснюватися підвищеною активністю протеїнкази G, що опосередковано регулюється NO [8]. Таким чином, у модельній системі *in vivo* за умов виразки шлунка щурів спостерігається загальна тенденція до зниження здатності тромбоцитів до агрегації.

Важливим для розуміння тонких механізмів регуляції гемостазу та розвитку патологічних станів є дослідження впливу претромбіну, що утворюється внаслідок гіперактивації системи зсідання крові, на функціонування судинно-тромбоцитарної ланки.

З метою дослідження впливу ФНФП на агрегаційну здатність тромбоцитів ми досліджували вплив претромбіну-1 на АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у нормі та за модельної виразки шлунка у щурів. На рис. 3 бачимо, що під впливом претромбіну-1 значно зменшується швидкість АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів. Враховуючи можливість накопичення претромбіну-1 за даної патології, можна зробити висновок про те, що він виконує певну регуляторну роль у патогенезі на ранніх етапах розвитку виразки шлунка. Можна також висловити припущення про участь претромбіну-1 в регуляції судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу як одного із засобів реалізації негативного оберненого зв'язку.

Висновки. 1. Виразкова хвороба шлунка окрім кровотеч супроводжується накопиченням розчинних фібрино-мономерних комплексів (РФМК), що свідчить про активацію системи зсідання крові.

2. Зміни у плазменному гемостазі за умов розвитку виразки шлунка тісно пов'язані зі змінами у тромбоцитарній ланці, тому у процесі лікування необхідний контроль як за вмістом маркерів активації системи зсідання крові, так і за функціональним станом тромбоцитів.

3. Функціонально неактивні форми протромбіну (ФНФП) можуть бути прогностичним показником дисбалансу як у плазменній, так і у тромбоцитарній ланках гемостазу.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беляев А.В., Заремба А.М., Платонова Т.Н. Гемостаз у больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений. 3. Крайние варианты отклонения гемостаза // Укр. биохим. журн. — 1997. — Т. 69, № 5–6. — С. 176–183. 2. Беляев А.В., Заремба А.М., Платонова Т.Н. Гемостаз у больных, оперированных по поводу абдоминальных кровотечений. 4. Концепция изменений гемостаза // Укр. биохим. журн. — 1997. — Т. 69, № 5–6. — С. 190–195. 3. Горницкая О.В. Особенности агрегации тромбоцитов при инфаркте миокарда // Эксперим. та клін. фізіологія і біохімія. — 2007. — № 4. — С. 54–60. 4. Гришук В.І., Чернищенко Т.М., Горницкая О.В. Роль протеину С у системе гемостаза та визначення його активності за різних патологій // Мед. хімія. — 2009. — Т. 11, № 1. — С. 11–17. 5. Заїчко Н.В., Чернищенко Т.М., Платонова Т.М., Волков Г.Л. Вплив розчинного фібрину на процеси зсідання крові та агрегації тромбоцитів // Укр. біохім. журн. — 2006. — Т. 78, № 3. — С. 118–123. 6. Королева Д.С., Деев В.А., Куповская С.И. и др. Определение функционально неактивных форм протромбина для контроля эффективности лечения антикоагулянтами непрямого действия // Лаб. диагностика. — Т. 2, № 48. — 2009. — С. 3–7. 7. Королева Д.С., Чернищенко В.О., Платонова Т.М. Тромбопластин та його використання у клінічній лабораторній діагностиці // Эксперим. та клін. фізіологія та біохімія. — 2007. — № 4. — С. 65–71. 8. Максимович Я.С. Активность синтазы оксида азота и протеинкиназы G в динамике развития стресс-индуцированных поражений слизистой оболочки желудка крыс / Максимович Я.С., Дробинская О.В., Остапченко Л.И. // Биология — наука XXI века: 12-я международ. Пущинская шк.-конф. молодых ученых: Сб. тез. (10–14 нояб. 2008 г.) — Пущино, 2008. — С. 92–93. 9. Момот А.П. Принципы, методы і засоби лабораторної діагностики патології системи гемостаза на сучасному етапі // Лаб. діагностика, 2004. — № 2. — С. 52–70. 10. Платонова Т.Н., Горницкая О.В. Выделение и свойства активатора протеина С из яда щитомордника обыкновенного (*Aghistrodon halys halys*) // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 3, С. 62–67. 11. Платонова Т.Н., Сушко Е.А., Петров А.В., Соловьев Д.А. Определение общего уровня протромбина и выявление его функционально неактивных форм с помощью фермента экамулина, выделенного из яда эфы многощетучатой // Укр. биохим. журн. — 1995. — Т. 67, № 4. — С. 75–79. 12. Платонова Т.Н., Черныщенко Т.М., Горницкая О.В. и др. Комплексная лабораторная диагностика нарушений системы гемостаза при диссеминированном внутрисосудистом свёртывании крови // Лабораторная диагностика. — 2000. — № 3. — С. 3–11. 13. Савчук О.М., Чернищенко В.О., Краснобрижа Є.М. та ін. Розчинні фібрин-мономерні комплекси — маркери розвитку внутрішньосудинного мікрозсідання крові // Клін. фізіологія та біохімія. — 2006. — № 1. — С. 57–63. 14. Сучасні методи лабораторної діагностики внутрішньосудинного мікрозсідання крові (методичні рекомендації). — К.: Наук. думка. — 1994. — 22 с. 15. Komarov A.L., Panchenko E.P., Dobrovolsky A.B. et al. D-dimer and platelet aggregability are related to thrombotic events in patients with peripheral arterial occlusive disease // Europ. Heart J. — 2002. — Vol. 23. — P. 1309–1316. 16. Kozek-Langenecker S.A., Masaki T., Mohammad H. et al. Fibrinogen Fragments and Platelet Dysfunction in Uremia // Kidney International. — 1999. — Vol. 56. — P. 299–305. 17. Laemli R.V. Cleavage of structural proteins during of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680–685. 18. Li Ma, Elliott S.N., Cirino G. et al. Platelets modulate gastric ulcer healing: Role of endostatin and vascular endothelial growth factor release // PNAS. — 2001. — Vol. 98, N 11. — P. 6470–6475. 19. Lin Chen, Rezaie A.R. Proexosite-1-dependent Recognition and Activation of Prothrombin by Taipan Venom // J. Of Biol. Chemistry. — 2004. — Vol. 279, N 17. — P. 17869–17874. 20. Lominadze D., Tsakadze N., Sen U. et al. Fibrinogen and its fragment D-induced vascular constriction // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2004. — Vol. 288. — P. 1257–1264. 21. Takagi K., Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer // Jpn. J. Pharmacol. — 1968. — Vol. 18. — P. 918. 22. Verheul H.M.W., Jorna A.S., Hoekman K. Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets // Blood. — 2000. — Vol. 96, N 13. — P. 4216–4221. 23. Wagner D., Burger P.C. Platelets in Inflammation and Thrombosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2003. — Vol. 23. — P. 2131–2137. 24. Wallace J.L., Dicay M., McKnight W., Dudar G.K. Platelets accelerate gastric ulcer healing through presentation of vascular endothelial growth factor // British J. of Pharmacol. — 2006. — Vol. 148. — P. 274–278.

**CHANGING OF PLATELET AND PLASMIC HAEMOSTASIS IN STOMACH
ULCER PATHOGENESIS**

*V.CHERNYSHENKO, I.MAKSYMOVYCH, D.KOROLOVA,
T.PLATONOVA, L.OSTAPCHENKO*

Haemostasis abnormalities are involved in stomach ulcer pathogenesis. There are a lot of concomitant complications slowing down the ulcer's healing, among them intravascular coagulation or bleeding. Therefore monitoring stomach ulcers requires an integrated evaluation of both platelet and plasmic contributions to haemostasis, namely platelet aggregation and plasmic haemostasis indicators that are directly dependent upon it. As shown in this paper, the presence of functionally inactive forms of prothrombin (FIFP) can be a suitable marker along with soluble fibrin monomeric complexes. An effective method of monitoring the FIFP is proposed.

Key words: stomach ulcer, platelets, prethrombin.

**ИЗМЕНЕНИЯ В ПЛАЗМЕННОМ И ТРОМБОЦИТАРНОМ ГЕМОСТАЗЕ ПРИ
ОСТРОЙ ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНИ ЖЕЛУДКА**

*В.А.ЧЕРНЫШЕНКО, Я.С.МАКСИМОВИЧ, Д.С.КОРОЛЕВА,
Т.Н.ПЛАТОНОВА, Л.И.ОСТАПЧЕНКО*

Нарушения функционирования системы гемостаза включены в патогенез язвенной болезни желудка. Они вызывают внутрисосудистое тромбообразование, кровотечения, тормозят процесс заживления язвы. Поэтому необходима комплексная оценка состояния плазменного и тромбоцитарного звеньев системы гемостаза при язвенной болезни желудка. Для этого необходимо проводить наблюдения за процессом агрегации тромбоцитов и показателями плазменного гемостаза, которые непосредственно связаны с клеточным звеном. Кроме растворимых фибрин-мономерных комплексов, как маркеры нарушений системы гемостаза нами определены функционально-неактивные формы протромбина. Предложен эффективный метод их выявления.

Ключевые слова: язва желудка, тромбоциты, претромбин.