

УДК 616.381-007.274-002.17:612.115

А.С. Кондратюк¹, Т.В. Гриненко¹,
В.А. Дєєв², Л.І. Лисак²,
О.О. Калашніков², С.І. Куповська²

ЗМІНИ РІВНЯ КОМПОНЕНТІВ ФІБРИНОЛІЗУ ПРИ РОЗВИТКУ СПАЙОК ЧЕРЕВНОЇ ПОРОЖНИНИ

¹ Інститут біохімії імені О.В. Паладіна
НАН України

² Національний інститут хірургії
та трансплантології імені О.О. Шалімова

Виникнення спайок в черевній порожнині відбувається внаслідок запальних процесів або травм внутрішніх органів, що призводить до абдомінальних патологій з різними клінічними проявами. В процесі утворення спайок черевної порожнини бере участь комплекс таких складних біологічних реакцій як запалення, коагуляція та фібриноліз. В зоні запалення або дії певного агресивного чинника (напр. хірургічне втручання) порушується цілісність та/або проникність судин, в результаті чого білки плазми крові потрапляють у черевну порожнину, куди з уражених тканин надходять також тканинні фактори коагуляції. Неактивні компоненти системи згортання набувають активної форми і запускається каскадний процес, що завершується утворенням фібрину на поверхні органів черевної порожнини. Такі відкладення фібрину мають високі адгезивні властивості та можуть призводити до утворення анастомозів між оболонками органів черевної порожнини [6, 10]. В нормі, позасудинні відкладення фібрину руйнуються фібринолітичною системою, яка знаходиться в збалансованому стані з системою коагуляції [4]. Проте, при цілому ряді захворювань та у відповідь на хірургічне втручання відбувається зниження фібринолітичного потенціалу плазми крові, що може бути однією з причин формування спайок [8]. Фібринолітичний потенціал в свою чергу залежить від рівня та функціональної активності компонентів фібринолітичної системи [1, 4, 9].

На сьогодні спайкова хвороба є досить поширеним явищем та гострою проблемою сучасної хірургії у всьому світі. Досі не існує засобів, що

100% попередять виникнення цього післяопераційного ускладнення [6, 8, 10].

Метою роботи було вивчення фібринолітичного потенціалу крові хворих на спайкову хворобу, що допоможе зрозуміти процес утворення спайок й можливі механізми та шляхи його запобігання.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували: рекомбінантний тканинний активатор плазміногену (alteplase ін'єкційного препарату "Актилізе (Actilyse) 50 мг", Boehringer Ingelheim International GmbH, Німеччина), тромбін (Технологія-Стандарт, РФ), стрептокіназу (123000 IU/мг білка, Белмедпрепарат, Білорусія), контрикал (AWD, Німеччина), хромогенний субстрат — Н-D-Val-L-Leu-L-Lys-п-нітроанілін·HCl (S 2251) (Chromogenix AB, Швеція), трис-(гідроксиметил)амінометан ("Merck", Німеччина), лізин-сефарозу ("Amersham Biosciences AB", Швеція), п-ХМБ (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Німеччина), електрофоретичні маркери молекулярної маси (Prestained Protein Ladder SM0671, Fermentas, Литва), неорганічні сполуки ступеню чистоти "хч" та "чда" вітчизняного виробника; мікротитраційні планшети (SARSTEDT, США).

Glu-плазміноген одержували з цитратної плазми крові донорів методом афінної хроматографії на лізин-сефарозі [7] в присутності контрикалу. Фібриноген одержували з оксалатної плазми крові бика шляхом фракціонування сульфатом натрію в присутності соєвого інгібітора трипсину [2]. DesAABB-фібрин одержували активацією фібриногену тромбіном [3], в присутності 0,05 М 6-аміногексанової кислоти та 0,09 М п-ХМБ.

Дослідження фібринолітичних параметрів проводили в плазмі крові 18 хворих на спайкову хворобу. Кров з ліктьової вени відбирали в пластикову пробірку, що містила 3,8 % розчин цитрату натрію, у співвідношенні 9:1. Центрифугували 20 хв при 2000 г. Плазму крові зберігали при -20°C. Рівень плазміногену (Пг), тканинного активатора плазміногену (t-PA), інгібітору активаторів плазміногену 1-го типу (PAI-1), α -2-антиплазміну та фібриногену визначали в зразках плазми крові, які відбиралися до операції (n=9), у першу (n=11), другу (n=12), третю (n=3),

четверту (n=5), п'яту (n=2), шосту (n=6), сьому (n=4), восьму (n=4) та дев'яту (n=8) добу після операції з видалення спайок. Рівень перерахованих компонентів системи гемостазу в плазмі крові донорів (n=10) приймали за норму.

Концентрацію фібриногену в плазмі крові визначали як описано [5].

Концентрацію функціонально активного Пг визначали турбідиметричним методом за часом напівлізису фібринового згустку. Для цього у термостатовану при 37°C кювету послідовно вносили: 20 мкл плазми, 15 МО стрептокінази, вероналовий буфер. Утворення фібринового згустку ініціювали додаванням в кювету фібрин-мо-

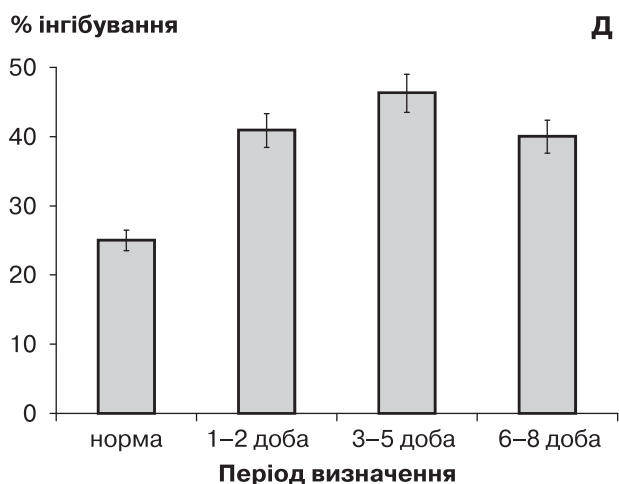
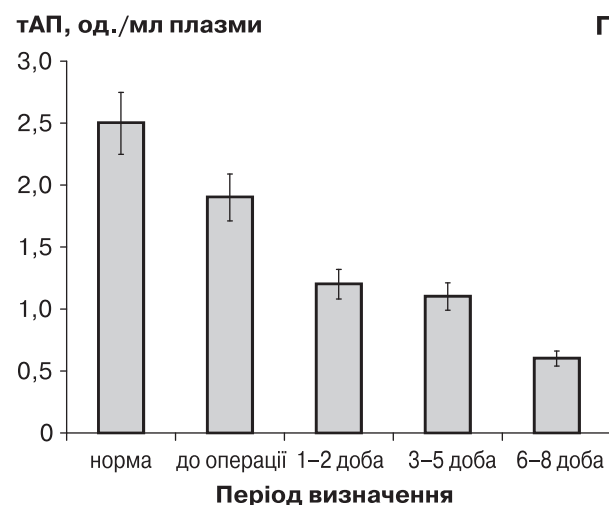
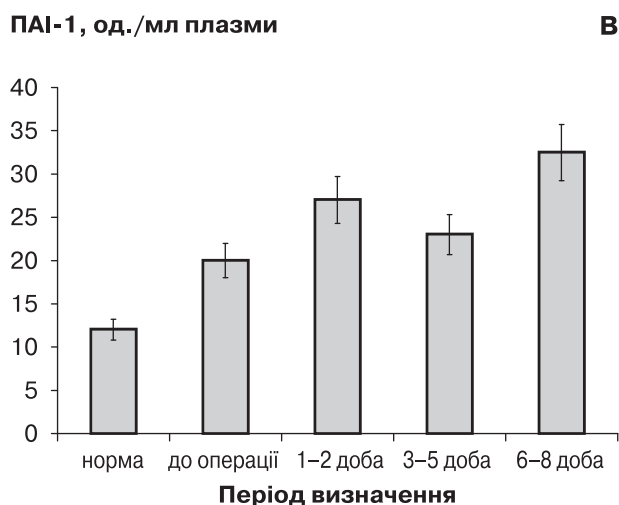
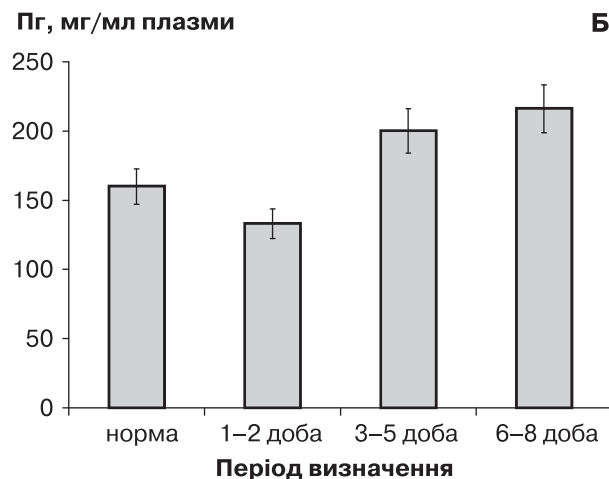
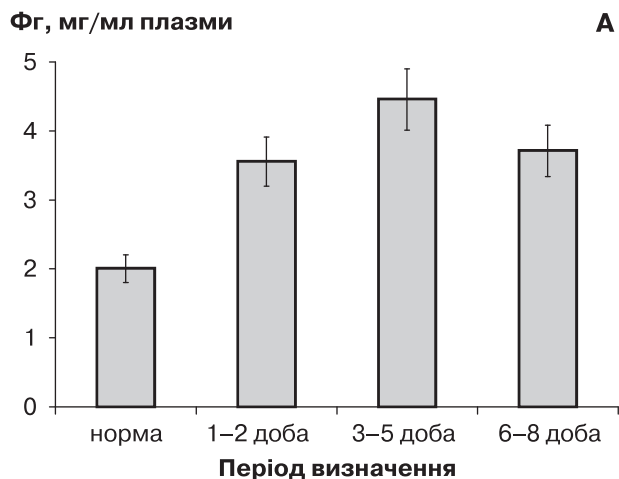


Рис. 1. Рівень фібриногену (А), плазміногену (Б), інгібітору активаторів плазміногену 1 (В), тканинного активатора плазміногену (Г), α -2-антиплазміну (Д) в плазмі крові хворих на спайкову хворобу в післяопераційний період

номеру ($0,67 \cdot 10^{-6}$ М). Загальний об'єм інкубаційного середовища складав 1 мл.

Реєстрували час зниження максимального значення оптичної густини на 50% ($t^{1/2}$, с) та розраховували швидкість лізису згустку ($1/t^{1/2}$, c^{-1}).

Для визначення активності α -2-антиплазміну у термостатовану при 37°C кювету послідовно вносили: 3 мкг плазміну, 10 мкл плазми, вероналовий буфер, фібрин-мономер ($0,67 \cdot 10^{-6}$ М). Реєстрували час зниження максимального значення оптичної густини на 50% ($t^{1/2}$, с), розраховували швидкість лізису згустку ($1/t^{1/2}$, c^{-1}) та відсоток інгібування плазміну. Зміни оптичної густини реакційного середовища реєстрували за довжини хвилі 350 нм на СФ 26 ЛОМО (РФ).

Рівень t-PA та PAI-1 в плазмі крові визначали згідно стандартної процедури тест-наборів COASET t-PA та COATEST PAI відповідно, з деякими модифікаціями: замість бромціанових фрагментів фібриногену вносили таку ж кількість desAABB-фібрину бика та для побудови калібрувальних кривих використовували рекомбінантний t-PA. Реакцію проводили в мікротитраційних планшетах, в трьох повторностях для кожної точки. Оптичну густину вимірювали на мікрорідері Multiskan EX Thermo (Китай) за двох довжин хвилі 405 і 495 нм та розраховували $\Delta A = A_{405} - A_{492}$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Стан системи фібринолізу оцінювали за рівнем Пг, t-PA, інгібітору активаторів Пг 1-го типу та α -2-антиплазміну. Окрім того визначали концентрацію фібриногену в плазмі крові. Одержані результати представлені на Рис.

Показали, що у пацієнтів до операції з резекції спайок концентрація в плазмі крові Пг, t-PA та фібриногену була в межах норми. В той час як інгібітори фібринолізу — α -2-антиплазміну та PAI-1, виявляли підвищений рівень активності на 40 та 60% відповідно. Цікаво відмітити, що в нормі активність PAI-1 складає від 7 до 15 МО/мл плазми, у хворих на спайкову хворобу вона складала 25 МО/мл (у окремих пацієнтів сягала 30 МО/мл).

В першу післяопераційну добу всі показники лишалися на тому ж рівні.

У другу післяопераційну добу спостерігалися різкі зміни рівня майже всіх показників. Концентрація фібриногену зростала вдвічі відносно норми і утримувалась на підвищеному

рівні до дев'ятої післяопераційної доби. Рівень Пг знижувався на 50%, разом з тим спостерігалося зниження активності α -2-антиплазміну, що може свідчити про інтенсивні фібринолітичні процеси в організмі. У окремих пацієнтів плазма крові була повністю виснажена на Пг, проте вже на третю—п'яту добу у всіх пацієнтів відбувалося відновлення концентрації Пг до рівня норми, а також спостерігалося підвищення активності α -2-антиплазміну до рівня попередніх показників.

З першої по восьму добу фіксували поступове зниження активності t-PA. Найнижчий рівень t-PA — 0,4 МО/мл, що в 3–4 рази нижче норми — спостерігався на 8-му післяопераційну добу. Паралельно з цим відбувалося підвищення активності PAI-1, яке досягало свого максимуму на 7–8 добу післяопераційного періоду.

Зміни рівня фібриногену, Пг та α -2-антиплазміну можуть бути пов'язані як з реакцією організму на хірургічне втручання, так і з перебігом процесу формування спайок.

На нашу думку, серед досліджуваних показників системи гемостазу найбільш інформативними є рівень активності t-PA та PAI-1. Можна прослідкувати взаємозв'язок між етапами формування спайок та коливанням активності цих компонентів системи фібринолізу. На першудругу добу після операції при формуванні спайок виникають дегенеративно-некротичні процеси в мезотелії органів [6], у відібраних в цей період зразках крові спостерігали зниження рівня активатору та підвищення рівня PAI-1. В наступні дні мезотелій зникає, це зумовлює адгезію органів, що контактують, і на шосту-восьму добу відбувається їх остаточне зрощення, саме в цей період фіксували максимальний рівень активності PAI-1 та зниження активності t-PA у 3–5 разів відносно норми.

Таким чином, у хворих на спайкову хворобу було зафіксовано зниження фібринолітичного потенціалу плазми крові, яке виражалось в підвищенні активності інгібіторів фібринолізу та зниженні рівня t-PA.

Встановлено взаємозв'язок рівня активності t-PA та інгібітору активаторів Пг з етапами формування спайок в черевній порожнині.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. *Диагностика и контролируемая терапия нарушенной гемостаза.* — М.: Ньюдиамед, 2001. — 285 с.
2. Варецька Т.В., Лосева А.Л., Яценко В.І. Про визначення активності тромбіну // *Укр. біохім.журнал.* — 1961. — № 33. — С. 657–666.

3. *Варецька Т.В. Одержання фібрин-мономеру та вивчення деяких його властивостей // Укр. біохім. журнал. — 1965. — Т. 37, № 2. — С. 194–206.*
4. *Долгов В.В., Свирич П.В. Лабораторная диагностика нарушенной гемостаза. — М.—Тверь: ООО “Издательство “Триада”, 2005. — 227 с.*
5. *Кондратюк А.С., Гриненко Т.В. Кількісне визначення фібриногену в плазмі крові турбідиметричним методом з використанням ацистрону // Фізика живого. — 2010. — Т. 18, № 1. — С. 151–154.*
6. *Тищенко В.В. Спайки брюшної порожнини. Некоторые вопросы патогенеза, профилактики и лечения // Клиническая хирургия. — 2010. — № 7. — С. 32–36.*
7. *Deutsch D.G., Mertz E.T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // Science. — 1970. — Vol. 170, № 3962. — P. 1095–1096.*
8. *Holmdahl L., Ivarsson M.-L. The Role of Cytokines, Coagulation, and Fibrinolysis in Peritoneal Tissue Repair // Eur J Surg. — 1999. — Vol. 165. — P. 1012–1019.*
9. *Lijnen H.R. Elements of the fibrinolytic system // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2001. — Vol. 936. — P. 226–236.*
10. *Attard J.-A.P., MacLean A.R. Adhesive small bowel obstruction: epidemiology, biology and prevention // Can J. Surg. — 2007. — Vol. 50 (4). — P. 291–300.*

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ КОМПОНЕНТОВ ФИБРИНОЛИЗА ПРИ РАЗВИТИИ СПАЕК БРЮШНОЙ ПОЛОСТИ

*А.С. Кондратюк, Т.В. Гриненко, В.А. Деев,
Л.И. Лысак, А.А. Калашников, С.И. Куповская*

Исследованы показатели системы фибринолиза (плазминоген, тканевой активатор плазминогена, ингибитор активаторов плазминогена I-го типа, альфа-2-антиплазмин и фибриноген) у больных спаечной болезнью брюшной полости. Установлена взаимосвязь уровня активности тканевого активатора плазминогена и ингибитора активатора плазминогена с этапами формирования спаек.

CHANGE OF LEVEL OF COMPONENTS OF FIBRINOLYSIS AT DEVELOPMENT OF ADHESION IN ABDOMINAL CAVITY

*A.S. Kondratiuk, T.V. Grynenko, V.A. Deyev,
L.I. Lysak, A.A. Kalashnikov, S.I. Kupovskaya*

We investigated the system indicators of fibrinolysis (plasminogen, tissue plasminogen activator, inhibitor of plasminogen activators I, an alpha-2-antiplasmin and fibrinogen) of patient with adhesive disease of abdominal cavity. The interrelation between activity levels of the tissue plasminogen activator and inhibitor of plasminogen activator I and stages of adhesion formation was ascertained.

УДК 616.151.5-079.4

В.В. Красівська

АЛГОРИТМ ДІАГНОСТИКИ ПОРУШЕНЬ У КОАГУЛЯЦІЙНОМУ ГЕМОСТАЗІ НА ОСНОВІ ТЕСТУ АКТИВОВАНОГО ПАРЦІАЛЬНОГО (ЧАСТКОВОГО) ТРОМБОПЛАСТИНОВОГО ЧАСУ

*Державна установа “Інститут патології крові та трансфузійної медицини АМН України”,
лабораторія імуноцитології та генетики пухлин
крові, м. Львів, Україна*

Зсідання крові — це багатоступеневий (каскадний) ферментативний процес, у якому беруть участь білки-протеази, неферментні білки акселератори та кінцевий субстратний білок — фібриноген. Система зсідання крові функціонує за двома механізмами: внутрішнім та зовнішнім. Стан внутрішнього каскаду активації протромбінази можна оцінити за допомогою базисного (скринінгового) тесту — активованого парціального (часткового) тромбопластинового часу (АПТЧ або АЧТЧ) [1, 12, 13]. Тест АПТЧ може виконуватись мануально (вручну) та на коагулометрах різної конструкції (оптичних, кулькових та ін.). При цьому важливо визначення проводити за допомогою високостандартизованих, якісних реагентів. Також значення має застосування тестованих еталонних контрольних, калібрувальних та патологічних плазм.

Принцип методу полягає у інкубації плазми з оптимальною кількістю фосфоліпідів та поверхневого активатора, що призводить до активації факторів внутрішнього механізму системи коагуляції в контрольованих умовах. Додавання солей кальцію ініціює процес, потім вимірюється час утворення фібринового згустку [1, 12, 13, 16].

Методологія [1, 12, 16, 18]. Матеріалом для тесту АПТЧ є цитратна збіднена на тромбоцити плазма. Збір венозної крові відбувається переважно з вен кубітальної ямки, зранку, натще або після легкої їжі без жирних продуктів. Джгут накладають з помірною силою стискання не довше, ніж на 1–2 хв. Кров набирають голкою з великим діаметром без шприца, що запобігає активації тромбоцитів. Застосовуються пластикові (або силіконовані) градуйовані пробірки. Перші краплі крові, у яких є велика кількість тромбопластину, бажано не набирати. Можна використовувати системи вакуумного забору