

Е.Л. Торянік

Особливості системи коагуляційного гемостазу у вагітних щурів зі спонтанною артеріальною гіпертензією

Нац. фармацевт. ун-т, Харків; E-mail: etoryanik@list.ru

Дослідження проведено на білих нелінійних щурах і щурах зі спонтанною гіпертензією. Встановлено, що у вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією найчастіше спостерігаються коагуляційні зсуви, затримка фібринолізу, гіперфібриногенемія та зміни у двох і більше ланцюгах гемостазу, що вказує на більш високий їх тромбогенний потенціал. На 19–20-ту добу гестації достовірно підвищується агрегація тромбоцитів з аденозиндифосфатом і адреналіном порівняно з вагітними білими нелінійними щурами. Агрегація тромбоцитів з колагеном була підвищена у невагітних щурів з артеріальною гіпертензією порівняно з вагітними. У цей самий період у вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією порівняно з тваринами без цієї патології зберігався більш високий вміст фібриногену і розчинних фібрин-мономерних комплексів, а також частота позитивного етанолового тесту, що підтверджувало наростаючий тромбогенний потенціал системи згортання крові у цих щурів. У вагітних щурів з артеріальною гіпертензією в порівнянні з вагітними без артеріальної гіпертензії і контролем достовірно вищими були значення еуглобулінового лізису. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між вмістом фібриногену і показниками, які відображають стан фібринолітичної системи на 19–20-ту добу гестації, що свідчить про відносно незалежне від гіперфібриногенемії уповільнення фібринолізу у вагітних білих нелінійних щурів (контроль).

Ключові слова: щури зі спонтанною гіпертензією, вагітність, судинно-тромбоцитарний гемостаз, коагуляційний гемостаз, протизгортальна система.

ВСТУП

Останнім часом екстрагенітальні захворювання займають провідне місце у структурі материнської та перинатальної смертності та мають чітку тенденцію до збільшення [1, 6, 9, 10]. Серед них особливо виділяється артеріальна гіпертензія (АГ), яка є центральною проблемою сучасного акушерства. У вагітних жінок з АГ є ризик відшарування плаценти, розвитку гострої ниркової недостатності, церебральних крововиливів, дисемінованого внутрішньосудинного згортання – патологічний синдром, в основі якого лежить активація судинно-тромбоцитарного або коагуляційного гемостазу (зовнішнього або внутрішнього), тяжкого ускладнення вагітності, яке характеризується тріадою симптомів: гемолізом, підвищенням вмісту печінкових ферментів і зниженням кіль-

кості тромбоцитів та еклампсії [4, 5, 7, 12, 14]. Водночас за останні роки сформована концепція, згідно з якою важливою патогенетичною ланкою ускладнень є тромбофілічні стани [12, 13]. Взаємозв'язки АГ та гемостазу у вагітних вивчені недостатньо або кількість цих досліджень розглядається безпосередньо у межах гестозу [2, 7, 11]. У зв'язку з цим актуальним залишається глибоке знання патогенезу АГ та безумовна оцінка тромболітичного ризику у жінок під час вагітності.

Дослідження процесів тромбо- та фібриноутворення, фібринолітичної активності і всієї системи гемостазу у вагітних щурів на тлі АГ не проводилися.

Мета нашої роботи – оцінка динаміки основних показників судинно-тромбоцитарного, коагуляційного гемостазу та протизгортальної системи крові у вагітних щурів з АГ.

© Е.Л. Торянік

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 4 групах тварин (по 10 щурів у кожній) масою 220–240 г. Нелінійні білі щури ввійшли до 1-ї (невагітні, інтактний контроль); до 2-ї групи (вагітні, фізіологічний контроль). Щури зі спонтанною гіпертензією склали 3-тю (вагітні) і 4-ту (невагітні) групи. Цих щурів отримували з розплідника «Біомодельсервіс» (Київ). У період акліматизації (2 тиж) та протягом дослідження щури знаходилися у віварії при 20–25°C, вологості не більше ніж 50 %, природному світловому режимі «день–ніч», у стандартних пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні.

Всі процедури з тваринами, а також виведення їх з експерименту проводили відповідно до національних «Загальних етичних принципів дослідів на тваринах» (Україна, 2001), що узгоджуються з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Індуковану агрегацію (індуктори агрегації – розчин аденозиндифосфату, колаген) тромбоцитів досліджували використовуючи лазерний агрегометр «Біола LA230-2» (Росія). Метод оснований на реєстрації змін світлопроникності збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП), що дає змогу вивчати не лише агрегацію, але і зміни форми тромбоцитів. Світлопроникність виражали у відсотках, причому ЗТП приймали за 0 %, а бідної тромбоцитами плазми (БТП) за 100 %.

Коагуляційні дослідження виконували за допомогою напівавтоматичного коагулометра DiaMed-CD-4 (Швейцарія), 4-канального фотометра (світлофільтр $\lambda = 405$ нм), з використанням реактивів фірми «Технологія-Стандарт» (Барнаул).

Вивчали активований час рекальцифікації (АЧР), активований частково тромбопластиновий час (АЧТЧ), вміст фібриногену за стандартними методиками [3].

Кількісну активність антитромбіну III оцінювали фотометричним методом з використанням хромогенного субстрату («Технологія-Стандарт», Барнаул). Для оцінки фібринолізу вивчали час XIIa-залежного еуглобулінового лізису згустка [4]. Як маркер протромбінемії використовували вміст розчинених фібрин-мономерних комплексів (РФМК) – РФМК-тест. Результати досліджень обробляли методом статистики за критерієм t Стьюдента (обчислювали середнє арифметичне та його стандартну похибку) на персональному комп'ютері з використанням програмного пакета «Start Soft». Для одержання статистичних висновків застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA, критерій Крускала–Уолліса), при порівнянні вибірок – методи множинних порівнянь (критерій Ньюмена–Кейлса) і критерій Манна–Уїтні. Для виявлення взаємозв'язку показників у межах групи використовували кореляційний аналіз Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що агрегація тромбоцитів з аденозиндифосфатом (АДФ) і адреналіном (табл. 1) була вище у вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією в порівнянні з фізіологічним контролем (2-га група), а агрегація з колагеном, що відображає секреторну активність тромбоцитів, була вище тільки у невагітних щурів з АГ (3-тя група) в порівнянні з вагітними (4-та група).

Збереження гіперагрегаційних зсувів у невагітних щурів 3-ї групи можуть бути патогенетичною основою для розвитку ускладнень гестації. Показники коагуляційного ланцюга гемостазу у вагітних щурів 4-ї групи характеризувалися підвищенням вмісту фібриногену і РФМК, а також більшою стривальністю позитивного етанолового тесту в порівнянні зі щурами без АГ і з гіпертензивним контролем, що є ознакою гіперкоагуляційного синдрому, який відіграє важливу роль у формуванні численних ускладнень під час вагітності.

Вже з 1-ї по 6-ту добу гестації (див. табл. 1) у вагітних щурів 4-ї групи в порівнянні зі значеннями у тварин 2-ї і 3-ї груп відмічали достовірне уповільнення фібринолізу. Достовірних відмінностей активності антитромбіну III не було.

Нами також проаналізовано частоту виявлення зсувів у різних ланцюгах гемостазу з 1-ї по 6-ту добу гестації у тварин 4-ї і 2-ї груп (рис. 1). Слід відмітити, що у вагітних щурів 4-ї групи в цей період достовірно частіше виявляються гіперкоагуляційні зсуви за відсутності статистично значущої різниці в частоті виявлення зсувів інших ланцюгів гемостазу. З 13-ї по 19-ту добу гестації прогресували гіперкоагуляційні та гіперагрегаційні зсуви, а також посилювалася депресія протизгортальних механізмів (уповільнення

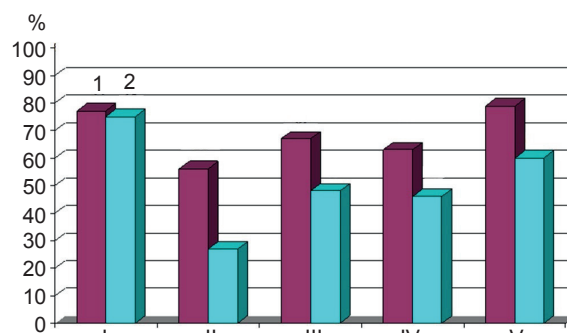


Рис. 1. Частота тромбогенних зсувів в системі гемостазу у вагітних щурів з 1-ї по 6-ту добу гестації: 1 – щури зі спонтанною гіпертензією, 2 – щури з фізіологічним перебігом вагітності; I – гіперагрегація, II – гіперкоагуляція, III – гіпофібриноліз, IV – гіперфібриногенемія, V – зсув у двох і більше ланцюгах. * $P \leq 0,05$ в порівнянні з вагітними без артеріальної гіпертензії

фібринолізу, зниження активності антитромбіну III; табл. 2).

Таблиця 1. Показники гемостазу у щурів з першої по шосту добу гестації ($\bar{X} \pm Sx$, $n = 10$)

Показники	Білі нелінійні щури		Щури зі спонтанною гіпертензією	
	невагітні (інтактний контроль; 1-ша група)	вагітні (фізіологічний контроль; 2-га група)	невагітні (3-тя група)	вагітні (4-та група)
Судинно-тромбоцитарний гемостаз				
Спонтанна агрегація тромбоцитів, %	2,5	2,8	1,9	1,6
Агрегація тромбоцитів, %				
з аденозиндифосфатом	56,2	58,5	66,9	62,3*
з адреналіном	46,8	48,6	53,2	56,2*
з колагеном	66,2	68,4	74,2*	71,3
Коагуляційний гемостаз				
Активованій час рекальцифікації, с	49,6±0,6	52,8±0,6	58,6±0,7*	57,2±0,4*
Активованій частково тромбопластиновий час, с	26,3±0,6	31,4±0,6	32,8±0,2	30,9±0,6
Фібриноген, г/л	3,4±0,2	3,7±0,2	4,0±0,2	4,9±0,4*
Розчинні фібрин-мономерні комплекси, мг/дл	3,8±0,2	4,4±0,3	6,4±0,2*	8,2±0,6*,**
Позитивний етаноловий тест, %	0	0	10,4	16,9
Протизгортальна система				
Еуглобуліновий лізис, хв	138±3,2	146±3,5	152±3,0*,**	174±4,5*,**
ХПа-залежний лізис, хв	8,6±0,2	9,3±0,54	8,0±0,75	9,1±0,45
Активність антитромбіну III, %	96,0	98,0	99,2	102,3

Примітки. Тут і в табл. 2 * $P < 0,05$ відносно інтактного і фізіологічного контролю; ** $P < 0,05$ відносно значень у невагітних щурів зі спонтанною гіпертензією.

Таблиця 2. Показники гемостазу у вагітних щурів з 13-ї по 19-ту добу гестації ($\bar{X} \pm S\bar{x}$, n=10)

Показники	Білі нелінійні щури		Щури зі спонтанною гіпертензією	
	невагітні (інтактний контроль; 1-ша група)	вагітні (фізіологічний контроль; 2-га група)	невагітні (3-тя група)	вагітні (4-та група)
Судинно-тромбоцитарний гемостаз				
Спонтанна агрегація тромбоцитів, %	2,6	2,9	2,4	1,9
Агрегація тромбоцитів, %				
з аденозиндифосфатом	55,8	58,9	68,2	67,2*
з адреналіном	47,6	54,8	59,4	58,6*
з колагеном	67,2	68,9	76,6	74,2*
Коагуляційний гемостаз				
Активованій час рекальцифікації, с	51,6±0,6	54,2±0,4	53,2±0,8 *	50,5±0,3*
Активованій частково тромбопластиновий час, с	27,2±0,4	31,8±0,6	32,4±0,2	30,9±0,1
Фібриноген, г/л	3,6±0,2	3,9±0,2	4,3±0,2	5,8±0,4*,**
Розчинні фібрин-мономерні комплекси, мг/дл	4,2±0,2	6,0±0,5	8,5±0,4*	10,0±0,5*,**
Позитивний етаноловий тест, %	0	0	16,4	35,2
Протизгортальна система				
Еуглобуліновий лізис, хв	146±4,5	188±5,5	210±5,0	216±8,0*
XIIa-залежний лізис, хв	8,2±0,25	8,4±0,12	8,5±0,16	8,8±0,22
Активність антитромбіну III, %	94,6	96,4	91,8	93,8

На рис. 2 показана частота зсувів різних ланцюгів гемостазу з 13-ї по 19-ту добу гестації у вагітних щурів з АГ та без неї. Слід відмітити збільшення цієї частоти у різних ланцюгах гемостазу у щурів 4-ї групи з 1-ї по 6-ту добу гестації. Так, достовірно частіше зустрічалися не тільки гіперкоагуляційні зсуви (84 щодо 69 %, $P < 0,05$), але і уповільнення фібринолізу (64 щодо 46 %, $P < 0,05$), гіперфібриногенемія (80 щодо 52 %, $P < 0,05$), а також зсуви в двох і більше ланцюгах гемостазу (91 щодо 75 %, $P < 0,05$) в порівнянні з вагітними щурами без АГ.

На 19–20-ту добу гестації у щурів 4-ї групи в порівнянні з 2-ю групою зберігався достовірно більш високий вміст фібриногену і РФМК, а також частота позитивного етанолового тесту, що підтверджувало наростаючий тромбогенний потенціал системи згортання

крові у щурів зі спонтанною гіпертензією. У щурів 4-ї групи в порівнянні з 2-ю і з 3-ю групою достовірно вищими був еуглобулі-

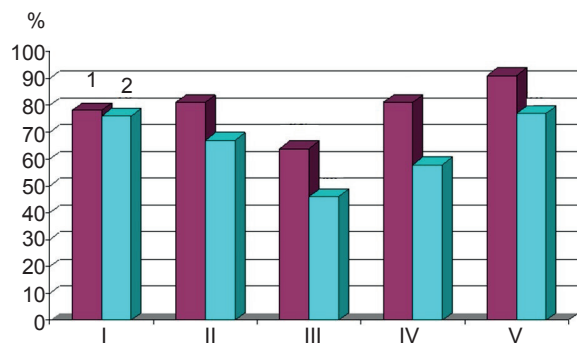


Рис. 2. Частота тромбогенних зсувів у системі гемостазу у щурів з артеріальною гіпертензією і без неї з 13-ї по 19-ту добу вагітності: 1 – щури зі спонтанною гіпертензією, 2 – щури з фізіологічним перебігом вагітності; I – гіперагрегація, II – гіперкоагуляція, III – гіпофібриноліз, IV – гіперфібриногенемія, V – зсув у двох і більше ланцюгах. * $P \leq 0,05$ в порівнянні з вагітними без артеріальної гіпертензії

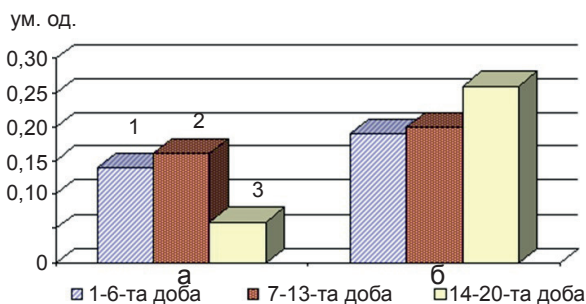


Рис. 3. Еуглобуліновий (а) та XIIIa-залежний лізис (б) у вагітних щурів з артеріальною гіпертензією: 1 – 1–6-та доба, 2 – 7–13-та доба, 3 – 14–20-та доба

новий лізис. Однак статистично значущих відмінностей активності антитромбіну III і XIIIa-залежного лізису ми не отримали. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між вмістом фібриногену і показниками, які відображають стан фібринолітичної системи на 19–20-ту добу гестації (рис. 3), що відображає відносно незалежне від гіперфібриногенемії уповільнення фібринолізу у вагітних білих нелінійних щурів.

ВИСНОВКИ

1. Зміни в системі гемостазу починають проявлятися з ранніх термінів вагітності та характеризуються зростанням гіперкоагуляційних зсувів на тлі прогресуючої затримки фібринолізу, що є ознакою гіперкоагуляційного синдрому, який відіграє важливу роль у формуванні численних ускладнень під час вагітності.

2. У групі вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією найчастіше спостерігаються коагуляційні зсуви, затримка фібринолізу, гіперфібриногенемія і зміни в двох і більше ланцюгах гемостазу, що вказує на більш високий тромбогенний потенціал у цих щурів.

3. Кількісні показники гемостазу на 19–20-ту добу гестації в групі вагітних щурів зі спонтанною гіпертензією свідчать про достовірно більш високі показники агрегації тромбоцитів з аденозиндифосфатом і адреналіном в порівнянні з тваринами з фізіологічним перебігом вагітності. Агрегація

тромбоцитів з колагеном була підвищена у невагітних щурів зі спонтанною гіпертензією у порівнянні з вагітними.

4. Виявлено слабкий кореляційний зв'язок між вмістом фібриногену і показниками, які відображають стан фібринолітичної системи та відносно незалежне від гіперфібриногенемії уповільнення фібринолізу у вагітних груп порівняння.

Робота виконана за науково-дослідною програмою Національного фармацевтичного університету «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування у медичній практиці» (№ держ. реєстр. 0103U00909478).

Э.Л. Торяник

ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМЫ ГЕМОСТА ЗА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Исследования проведены на белых нелинейных крысах и крысах со спонтанной гипертензией. Установлено, что в группе беременных крыс с артериальной гипертензией чаще всего наблюдались коагуляционные сдвиги, задержка фибринолиза, гиперфибриногенемия и изменения в двух и более цепях гемостаза, что отражает более высокий тромбогенный потенциал системы свертывания крови. Количественные показатели гемостаза на 19–20-е сутки гестации свидетельствуют о достоверно высоких показателях агрегации тромбоцитов с аденозиндифосфатом и адреналином в сравнении с животными с физиологической беременностью. Агрегация тромбоцитов с коллагеном была выше у небеременных крыс с артериальной гипертензией в сравнении с беременными с артериальной гипертензией. В этот же период гестации у беременных крыс с артериальной гипертензией сохранялось достоверно более высокое содержание фибриногена и растворимых фибрин-мономерных комплексов, а также частота позитивного этанолового теста, что подтверждает тромбогенный потенциал системы свертывания крови. У беременных крыс с артериальной гипертензией в сравнении с группой без артериальной гипертензии и контролем достоверно были высокими значения эуглобулинового лизиса. Проведенный корреляционный анализ содержания фибриногена и показателей, которые отображают состояние фибринолитической системы на 19–20-е сутки гестации, выявил слабую связь между ними, что свидетельствует о независимой от гиперфибриногенемии задержки фибринолиза у беременных белых нелинейных крыс (контроль).

Ключевые слова: крысы со спонтанной гипертензией,

беременность сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, коагуляционный гемостаз, противосвертывающая система.

E.L.Toryanik

HEMOSTATIC FEATURES IN HYPERTENSIVE PREGNANT RATS

The paper represents the study results of hemostasis in pregnant SHR rats. It is found that in the group of pregnant SHR rats the coagulation shifts are frequently observed, accompanied by fibrinolysis delay, hyperfibrinogenemia and changes in 2- and more hemostasis chains, indicating the higher thrombogenic potential in SHR group. The hemostasis quantitative performance at 19-20 days of gestation in a group of pregnant rats shows higher rates reliability of platelet aggregation with adenosine diphosphate and epinephrine in comparison with animals having physiological pregnancy. Platelet aggregation with collagen is increased in SHR- rats than in pregnant rats with hypertension. In the same period of gestation (19-20 days), higher levels of fibrinogen and soluble fibrin monomer complexes, and the frequency of positive ethanol test were fixed in pregnant SHR rats compared with the group without hypertension. This confirms the growing thrombogenic potential of blood coagulation in SHR rats. The euhlobulin lysis performance was significantly higher in pregnant rats with hypertension than in the group without hypertension and control. Correlative analysis between fibrinogen levels and indicators was conducted. It reflected the fibrinolytic system state at 19-20 days of gestation and revealed a weak relationship between them independently of fibrinolysis slowing hyperfibrinogenemia in pregnant group.

Key words: SHR-rats, gestation, vascular-platelet hemostasis, coagulation hemostasis, anticoagulant system, arterial hypertension.

Kharkiv National pharmaceutical University

REFERENCES

1. Dobrokhotova JE, Dzhalbava EM, Stepanyan AV. Actual issues of miscarriage: a collection of clinical lectures. Moscow: Medicina; 2007 [Russian].
2. Alyautdinov OS. Importance of the hemostatic system research in patients with uncomplicated pregnancy

- and predicting thrombohemorrhagic complications. *Obstetrics and Gynecology*. 1999; (2):18-23 [Russian].
3. Barkagan ZS, Momot AP. Diagnosis and treatment of hemostatic disorders controlled. Moscow: Nyudiamed; 2008 [Russian].
4. Belugina OS. Diagnosis of hemostatic disorders in pregnant women with placental insufficiency and neonatal. *Siberian Medical Journal*. 2010; 25(4):57-59 [Russian].
5. Vartapetova IV. Hypertension during pregnancy. Preeclampsia. Eclampsia. Moscow: FGBI «Scientific Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology; 2012 [Russian].
6. Krivtsova EV, Vertkin AL. Issues of planned and emergency treatment of extragenital diseases in pregnant women. Moscow: *Obstetrics and gynecology*. 2010;(4):37-40 [Russian].
7. Repina MA. Preeclampsia as a cause of maternal mortality. *Obstetrics and women diseases*. 2000; (3):11-18 [Russian].
8. Sernov LN. Statistical methods for assessing the reliability of the results of pharmacological studies. Moscow: *Elements of Experimental Pharmacology*. 2000;308-15 [Russian].
9. Sidelnikova VM. Haemostasis and pregnancy. Moscow: Triad. 2004 [Russian].
10. Stryuk RI. Pharmacotherapy and analysis of pregnancy and perinatal outcomes in women with hypertension. *Cardiology*. 2009;12:29-32.
11. Schiffman EM. Pre-eclampsia, eclampsia, HELLP - syndrome. Petrozavodsk. 2002;353-75.
12. Agnieszka, SM. Inherited thrombophilia in women with recurrent miscarriages and pregnancy loss in anamnesis - own experience text. *Ginekol Pol*. 2008;79(9): 630-34.
13. Bates SM. Venous thromboembolism, thrombophilia, antithrombotic therapy and pregnancy: American College of Chest Physicians Evidence. Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). 2008; 133:844-60.
14. Bellamy L, Casas JP, Hingoroni AD, Williams DJ. Preeclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007; 974-82.
15. Hawkins TL, Roberts JM. Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG* 2012; 119:484-92.

Матеріал надійшов до редакції 05.06.2014