

УДК 612.015

Взаимосвязь между нарушениями системы гемостаза и липидными, белковыми компонентами тромбоцитарных мембран при гемофилии

В.М. Саргсян

*Гематологический центр им. проф. Р.О.Еоляна МЗ РА
0014, Ереван, ул. Г. Нерсисяна, 7*

Ключевые слова: гемофилия, тромбоциты, фосфоинозитиды, АТФазы, фосфолипаза A_2

В ряду наследственно обусловленных тромбоцитопатий гемофилия занимает одно из важнейших мест, вследствие большого риска инвалидизации пациентов, а также высокой детской и юношеской смертности. Гемофилия является врожденным заболеванием, проявляющимся у лиц мужского пола геморрагическим синдромом гематомного типа. Прогноз в отношении выздоровления неблагоприятный и зависит от степени тяжести заболевания, своевременности и адекватности терапии [1, 7].

По современным представлениям гемофилия связана с низким содержанием, количественной и качественной недостаточностью какого-либо одного из факторов свёртывания крови. Этот дефицит вызван мутациями гена фактора свертывания крови.

По недостаточности определенного фактора различают следующие основные типы гемофилии: А (дефицит VIII фактора – фVIII), В (дефицит IX фактора – фIX) и С (дефицит XI фактора – фXI). Гемофилия А встречается чаще, чем гемофилия В, и составляет 80-85% всех случаев гемофилии. Гемофилия наследуется по рецессивному признаку, сцепленному с половой X хромосомой, при этом наследуются один и тот же тип гемофилии и одинаковая тяжесть заболевания. В общей популяции больных гемофилией 30-40% случаев приходится на спорадическую гемофилию, которая обусловлена случайной патологической мутацией гена.

Исходя из ключевой роли тромбоцитов в процессах свертывания крови целью данного исследования явилось изучение взаимосвязи между нарушениями гемостаза и изменениями липидных, белковых компонентов тромбоцитарных мембран при гемофилии.

Материал и методы

Исследования проводились в мембранах тромбоцитов 32 пациентов с гемофилией А. Контролем служила кровь 30 практически здоровых (без нарушений гемостаза) лиц. Для оценки состояния коагуляционного звена гемостаза использовали общепринятые клинические тесты: активированное парциальное тромбопластиновое время, количественное определение фактора VIII, протромбиновый индекс, тромбиновое время, концентрацию фибриногена на аппарате "STAGO ST-4". По содержанию фактора VIII пациенты условно были разделены на 2 группы: с высоким (5% и более) и низким (менее 5%) содержанием фактора VIII (I и II группы).

Тромбоциты выделяли по модифицированному методу McCarty O.J. et al. [4]. Фракционирование полифосфоинозитидов осуществляли методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля марки ЛС 5/40 (Чехия), в системе растворителей хлороформ:метанол:аммиак (45:35:10) [6].

В тромбоцитарных мембранах определение активности Na/K-АТФазы проводили по модифицированному методу Xie Z.J. et al. [10], а Ca-АТФазы – по Dean W.L. [2], основанным на регистрации прироста неорганического фосфора в среде в ходе АТФазной реакции. Активность ферментов выражали в мкг неорганического фосфора на мг белка. Оптическую плотность измеряли на СФ-46 при длине волны 700 нм. Статистическая обработка данных производилась с использованием критерия достоверности и различий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований в тромбоцитах крови обеих групп выявлено существенное нарушение метаболизма фосфоинозитидов (ФИ) (рис.1). Полученные данные свидетельствовали о количественных и качественных сдвигах в спектре полифосфоинозитидов при гемофилии А в группах пациентов с разным содержанием фактора VIII.

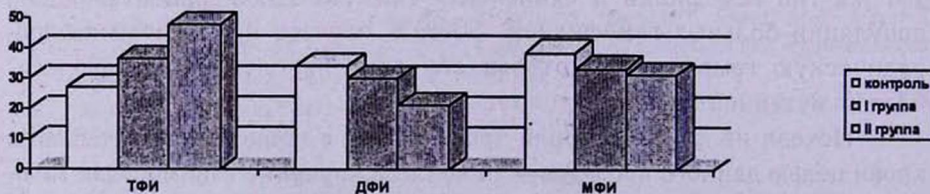


Рис.1. Изменение относительного содержания (в % от суммы) полифосфоинозитидов тромбоцитарных мембран при гемофилии разной степени тяжести

Так, у пациентов первой группы с высоким содержанием фактора VIII и сравнительно легким течением заболевания наблюдается повышение относительного содержания трифосфоинозитидов (ТФИ), при одновременном снижении уровня дифосфоинозитидов (ДФИ) и монофосфоинозитидов (МФИ). У пациентов второй группы эта закономерность усиливается, при этом уровень ДФИ снижается в 1.6 раза, а содержание ТФИ повышается в 1.7 раза.

Особый интерес представляли исследования особенностей изменения величин коэффициентов соотношений полифосфоинозитидов. По нашим данным (таблица), как легкое, так и тяжелое течение гемофилии А характеризуется значительным изменением всех изученных показателей.

Таблица

Изменение коэффициентов соотношений полифосфоинозитидов тромбоцитов крови пациентов с гемофилией А разной степени тяжести

Соотношения	Контроль n=30	I группа n=20	II группа n=12
ТФИ/ДФИ	0.79	1.2	0.40
ТФИ/МФИ	0.70	1.1	0.46
ДФИ/МФИ	0.89	0.90	1.15

У пациентов из первой группы наблюдалось статистически достоверное повышение коэффициентов соотношений ТФИ/ДФИ и ТФИ/МФИ, при этом значение коэффициента ДФИ/МФИ остается в пределах контрольных величин. Тяжелое течение заболевания, отмечаемое у пациентов второй группы приводит к резкому, почти двукратному, снижению коэффициентов соотношений ТФИ/ДФИ и ТФИ/МФИ, при одновременном повышении коэффициента ДФИ/МФИ. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении метаболизма изученных компонентов фосфоинозитидного цикла, что проявляется значительным изменением липид-липидных соотношений в мембранах тромбоцитов при изученных состояниях организма.

По данным ряда авторов [1, 8, 9], нарушение деятельности ФИ-сигнальной системы стимулируется изменением содержания тромбина, запускает каскад реакций арахидоновой кислоты, фосфорилирование ряда белков, мобилизует Ca^{2+} в клеточном пространстве и изменяет транспортные процессы.

Это подтверждается также исследованием деятельности транспортных АТФаз и фосфолипазы A_2 (ФЛА_2). Согласно полученным данным (рис.2), у пациентов обеих групп наблюдается активация Na^+/K^+ -и Ca^2+ -АТФаз, свидетельствующая о нарушении в условиях патологии транспорта Na^+ , K^+ и Ca^{2+} .

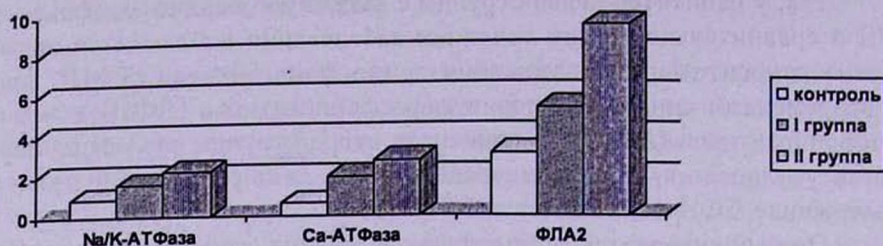


Рис.2. Активность транспортных АТФаз и ФЛА₂ в тромбоцитах крови при гемофилии разной степени тяжести

Зарегистрированное нами снижение уровня ДФИ, стимулированное факторами активации тромбоцитов, и мобилизация Ca^{2+} в цитоплазме способствуют вторичной активации тромбоцитов, ресинтезу ТФИ (что также выявлено нами), нарушению процессов окислительного фосфорилирования [1, 3, 5, 8].

Повышение активности ФЛА₂ указывает на интенсификацию в этих условиях процессов гидролиза мембранных фосфолипидов и запуск реакции арахидонового каскада, и вследствие этого повреждение биомембран.

Эти закономерности наиболее четко прослеживаются в группе пациентов с тяжелой степенью тяжести заболевания, свидетельствуя о глубоких деструктивных процессах тромбоцитарных мембран у этой категории больных.

Поступила 03.07.09

Մակարդման համակարգի և թրոմբոցիտար բաղանքի սպիտակուցային և լիպիդային բաղադրիչների խանգարումների միջև կապը հեմոֆիլիայի ժամանակ

Վ.Մ. Սարգսյան

Ժառանգաբար փոխանցվող թրոմբոցիտոպաթիաների շարքում հեմոֆիլիան համարվում է առաջատար, քանզի այն բարձր ռիսկի գործոն է՝ հիվանդների հաշմանդամության, ինչպես նաև մանկական և պատանեկան տարիքի մահացության առումով:

Առաջացման պատճառ է հանդիսանում մակարդման գործոններից որևէ մեկի կամ մի քանիսի որակական և քանակական անբավարարությունը:

Ըստ մակարդման գործոնների անբավարարության տարբերում ենք հեմոֆիլիայի հետևյալ տեսակները. հեմոֆիլիա A (VIII-գործոն) հեմոֆիլիա B (IX-գործոն), հեմոֆիլիա C (XI-գործոն):

Ելնելով մակարդման գործընթացում թրոմբոցիտների առաջատար

դերից՝ հեմոֆիլիայի ժամանակ ուսումնասիրվել են հեմոստազի և թրոմբոցիտար քաղաճի ճարպային և սպիտակուցային բաղադրիչների խանգարումների միջև եղած կապը:

Պարզվել է, որ ըստ ծանրության աստիճանի հեմոֆիլիայի ժամանակ նկատվում է արյան թրոմբոցիտներում ինչպես Na/K-, Ca-ԱՄՖ-ազային, այնպես էլ ֆոսֆոլիպազա A2-ի ակտիվության էական բարձրացում: Նմանատիպ պատկեր նկատվում է ֆոսֆոլինոզիդային ազդանշանային համակարգի ուսումնասիրման ժամանակ:

Interaction between the disorders in the system of hemostasis and lipid and protein components of platelete membranes in hemophilia

V. M. Sargsyan

Among hereditary trombocytopathies hemophilia ranks as a leader, as it is a risk factor for invalidity of patients, and also the infantile and youth mortality. The prognosis for recovery is unfavourable and also depends on severity of the disease, timeliness and adequacy of therapy.

The interaction between the state of hemostasis and lipid and protein components of platelet membranes has been studied in patients with hemophilia A. It has been demonstrated that in blood platelets depending on the severity of hemophilia a significant rise of Na/K, Ca/ATPase as well as phospholipase A₂ activities is observed. The same result is found in the signal system of phosphoinositides study.

Литература

1. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2000, 1, p. 11–21.
2. Dean W.L., Chen D., Brandt P.C., Vanaman T.C. Regulation of platelet plasma membrane Ca²⁺-ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, p. 15113–15119.
3. Downes C.P., Gray A., Lucocq J.M. Probing phosphoinositide functions in signalling and membrane trafficking. *Trends Cell. Biol.*, 2005, v.15, p.259–268.
4. McCarty O. J., Zhao Y.S. et al. Evaluation of the role of platelet integrins in fibronectin-dependent spreading and adhesion. *J. Thromb. Haemost.*, 2004, 2, p.1823–1833.
5. Pendaries C., Tronchere H., Plantavid M., Payrastre B. Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett.*, 2003, 546, p. 25–31.
6. Pettitt T. R., Dove S.K. et al. Analysis of intact phosphoinositides in biological samples. *Journal of Lipid Research*, 2006, v. 47, p. 1588–1596.
7. Reding M.T., Wu. H. et. al. Sensitization of CD4+ T cells to coagulation factor VIII: response in congenital and acquired hemophilia patients and in healthy subjects. *Thromb. Haemost.*, 2000, 84, p. 643–652.
8. Simonsen A., Wurmser A.E., Emr S.D., Stenmark H. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2001, v.13, p.485–492.
9. Strehler E.E., Zacharias D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol. Rev.*, 2001, v.81, p.21–50.
10. Xie Z.J., Wang Y.H. et. al. Determination of total (Na⁺,K⁺)-ATPase activity of isolated or cultured cells. *Anal. Biochem.*, 1989, 183, p.215–219.