

УДК 616.007.29, 616.155.1, 616-002.151

Изменение молекулярной организации эритроцитарных мембран при болезни Шенлейна-Геноха

Л.Г. Симонян

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

Ключевые слова: геморрагический васкулит, болезнь Шенлейна-Геноха, эритроцитарная мембрана, фосфолипиды

Болезнь Шенлейна-Геноха (геморрагический васкулит-ГВ) является одним из самых распространенных и хорошо известных среди геморрагических заболеваний, относящихся к группе иммунокомпетентных вазопатий инфекционно-аллергической природы, в основе которых лежит асептическое воспаление и дезорганизация стенок микрососудов с последующим вовлечением в процесс системы гемостаза, приводящим к гиперагрегации тромбоцитов и гиперкоагуляции [6]. Между тем эритроциты, наряду с тромбоцитами, способны выступать в качестве пускового механизма развития тромботических осложнений при васкулитах, приводя к ухудшению кровоснабжения органов и тканей, тем самым влияя на прогноз заболевания. Наличие на мембране эритроцитов мест связывания сигнальных молекул различной природы предполагает их участие в изменении основных микрореологических свойств эритроцитов (агрегации и деформации). Посредством чрезвычайно активной мембраны они принимают участие и в поддержании иммунного гомеостаза, что достигается адсорбцией антигенов на поверхности эритроцитов. Снижение экспрессии рецепторов для комплемента и циркулирующих иммунных комплексов на эритроцитах отмечено при ряде аутоиммунных заболеваний, в том числе и болезни Шенлейна-Геноха [8, 17].

Доказано, что снижение деформируемости эритроцитарных мембран и изменение их поверхностной архитектоники в первую очередь обусловлены интенсификацией процессов перекисного окисления липидов и несостоятельностью систем антиоксидантной защиты красных клеток крови [12]. Являясь важным структурным компонентом эритроцитарной мембраны, фосфолипиды (ФЛ) регулируют активный и пассивный трансмембранный транспорт веществ, определяют чувствительность клеток к действию лигандов, детерминируют активность

мембранносвязанных ферментативных систем [3, 7]. С другой стороны, нарушение ионного состава эритроцитов, регулируемого активностью ионтранспортных систем, приводит к нарушению осмотического баланса и снижению продолжительности их жизни.

Однако вопрос о характере изменений основных липидных и белковых компонентов эритроцитарных мембран при болезни Шенлейна-Геноха в литературе освещен недостаточно и требует дальнейшего изучения. Отсутствует комплексный сравнительный анализ структурно-функционального состояния мембран эритроцитов у больных с различной формой ГВ. Недостаточно изучены взаимосвязи клинических особенностей течения болезни, структурно-метаболических характеристик эритроцитарных мембран с гемореологическими параметрами.

Целью работы явилось комплексное исследование структурно-метаболического статуса для выявления их возможной роли в патогенезе ГВ и формировании гемореологических расстройств.

Материал и методы

Под наблюдением находилось 45 больных ГВ в возрасте от 14 до 60 лет, в том числе 27 мужчин и 18 женщин. Контрольная группа состояла из 20 здоровых лиц и была сопоставима с основной по возрастному и половому составу. Диагноз определяли с использованием классификационных критериев АКР по Mills [20]. Больные ГВ в зависимости от клинической формы заболевания были разделены на 3 группы: в I группу вошли 15 больных с кожно-суставной формой ГВ, во II – 15 больных с абдоминально-почечной формой, в III – 15 больных смешанной формой с рецидивирующим течением.

В исследованиях использовались эритроциты периферической крови. Мембрану эритроцитов получали с использованием гипосмотического гемолиза. Общие липиды экстрагировались из ацетоновых порошков в смеси растворителей метанол : хлороформ.

Фракционирование ФЛ осуществляли методом одномерной тонкослойной хроматографии в модификации Казаряна П.А. [5] на закрепленном слое силикагеля. Для разделения использовали систему растворителей хлороформ – метанол – вода. В каждой фракции определяли содержание липидного фосфора [10].

Активность Са-АТФазы определяли по разнице между общей и Mg-АТФазной активностью. При этом измерение проводили в присутствии и отсутствии 0,1 mM CaCl_2 [10]. Оценку экто-5'-нуклеотидазной активности осуществляли по методу Muszbek et al. [11]. Изменение АТФазной и экто-5'-нуклеотидазной активности регистрировали по приросту неорганического фосфора в инкубационной среде, а активность выражали в микромолях P_i /ч/мг белка. Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry et al. [18].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с учетом t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют, что ГВ характеризуется изменением важнейших биохимических характеристик в мембранах эритроцитов во всех группах больных. Так, у пациентов с кожно-суставным синдромом регистрируется понижение процентного содержания фосфатидилхолинов (ФХ) – в 1,7 раза, фосфатидилэтаноламинов (ФЭ) – в 2 раза и дифосфатидилглицеринов (ДФГ) – в 1,6 раза. Характерно, что указанные изменения сопровождаются статистически достоверным повышением уровня лизофосфатидилхолинов (ЛФХ). Одной из причин снижения содержания фракций ФЭ и ФХ может являться усиление их распада в мембране эритроцитов под действием фосфолипазы A_2 с отщеплением жирных кислот, в частности арахидоновой кислоты. Окислительная деструкция ФХ и ФЭ, связанная с большой насыщенностью жирнокислотного состава этих фракций, способствует уменьшению активности противорадикальной системы мембраны и снижению активности мембранноассоциированных ферментов [22]. Несомненно, что снижение количества ФХ обусловлено, главным образом, повышенной активностью фосфолипаз и перекисного окисления липидов в мембране эритроцитов. Повышенное же содержание ЛФХ, по-видимому, способствует активации макрофагов и Т-лимфоцитов, модуляции агрегации тромбоцитов [11]. Полагают, что одним из важных патогенетических факторов гемореологических расстройств при данном заболевании являлось повышение уровня фосфатидилсеринов (ФС), что обусловлено существенным влиянием данного ФЛ на систему гемостаза и на компоненты гуморального иммунитета в силу своей способности активировать сериновые протеазы, в том числе и комплемент [4].

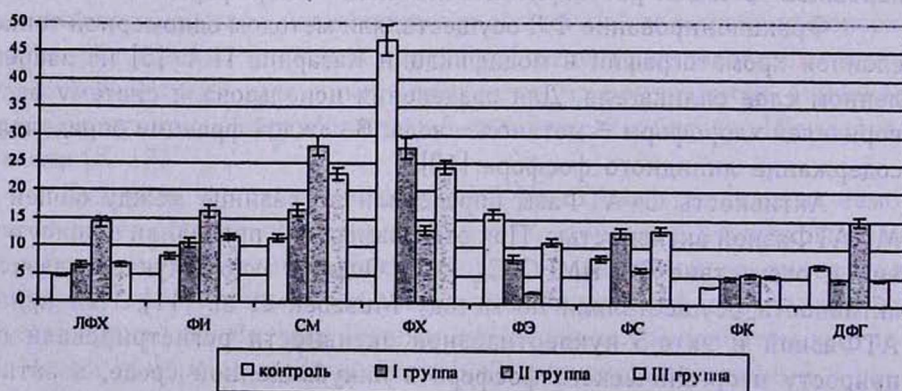


Рис. 1. Изменение профиля мембранных фосфолипидов в эритроцитах крови при ГВ (в % от суммы)

У II группы больных сдвиги в ФЛ спектре эритроцитарных мембран носят более выраженный характер, свидетельствуя о явной деструкции мембран (рис.1). Так, наблюдается резкое снижение доли ФХ (в 3,6 раза) и ФЭ (в 8раз) с одновременным увеличением количества ЛФХ (в 3,1 раза), фосфоинозитидов (ФИ) (в 2 раза) и сфингомиелинов (СМ) (в 2,4 раза). Снижение основных ФЛ фракций приводит к нарушению жидкостных свойств клеточных мембран, уменьшению величины суммарного отрицательного заряда и, как следствие, к изменению агрегационной активности эритроцитов. В ряде работ показано, что снижение общего содержания ФЛ в мембране эритроцитов, происходящее преимущественно за счет уменьшения доли ФХ и ФЭ, является одним из признаков старения эритроцитов [1]. При этом снижение доли ФЭ обуславливает нарушение внутриэритроцитарного гомеостаза, угнетение антиокислительной активности липидов. Повышенное содержание ДФГ и ФК, как известно являющихся природными кальциевыми ионофорами, способствует повышению содержания внутриклеточного кальция. Увеличение внутриклеточного кальция, в свою очередь, снижает деформируемость мембран эритроцитов и играет заметную роль в генезе анемий [13]. Обращает на себя внимание достаточно высокое содержание ДФГ, что, на наш взгляд, является компенсаторно-приспособительным в условиях сниженного уровня основных ФЛ.

Изменения в ФЛ спектре у больных с рецидивирующим течением болезни носят компенсаторный характер, наблюдается заметное увеличение уровней ФХ и ФЭ – основных ФЛ эритроцитарной мембраны, на фоне снижения доли цитотоксичных ЛФХ. По-видимому, отмечается компенсаторное увеличение популяции молодых эритроцитов. Повышенное содержание ФС (в 1,6 раза) может служить одной из причин, способствующей повышению агрегационной активности эритроцитов. Более того, регистрирующийся в таких случаях флип-флоп переход ФС в наружный липидный бислой, в свою очередь, может инициировать активацию Ca^{2+} -зависимой внутриклеточной сигнальной системы [9].

Согласно общепризнанной концепции, существенную роль в патогенезе различных заболеваний играют не столько сдвиги в содержании отдельных представителей ФЛ, сколько изменения в постоянстве филогенетически сложившихся липид-липидных отношений. Обнаруженное при ГВ повышение соотношений ЛФХ/ФХ и ФК/ФХ можно трактовать как активацию процессов деградации липидов в первом случае и угнетение их биосинтеза – во втором. При этом изменения, происходящие у II группы больных, наиболее выражены. Отмечается также снижение отношения ФЭ/ФХ, обуславливающего, наряду с отношением холестерин/ФЛ, снижение вязкости мембраны. Можно предположить, что у больных в острой фазе болезни (I и II группа) наблюдается увеличение популяции старых эритроцитов, обладающих,

как известно, иммуностимулирующей активностью [9]. А характерной особенностью старых эритроцитов является повышенная микровязкость плазматической мембраны, что коррелирует с нашими данными (рис. 2). На увеличение вязкости наружного слоя мембраны указывает повышение отношения СМ/ФХ. Увеличение уровня СМ в мембране способствует уменьшению подвижности ацильных цепей жирных кислот ФЛ, что может привести к повышению упорядоченности липидных молекул и снижению текучести мембраны эритроцитов. Между тем изменение вязкоэластичных свойств мембраны эритроцитов и потеря деформируемости, в конечном итоге, приводят к нарушению микроциркуляции.

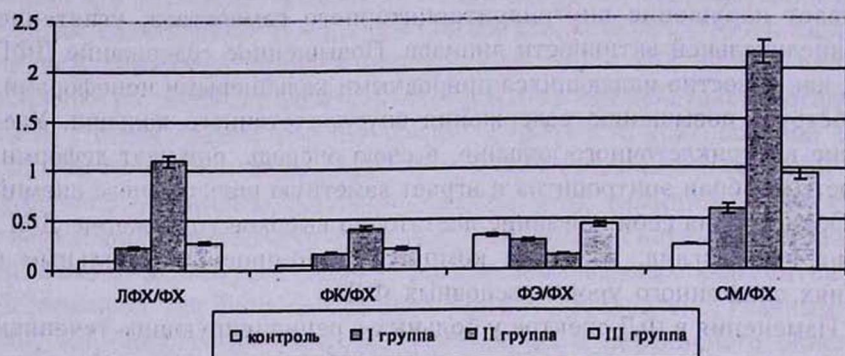


Рис. 2. Изменение фосфолипид-фосфолипидных соотношений в мембранах эритроцитов крови при ГВ

Поддержание текучести эритроцитарных мембран на оптимальном уровне необходимо для осуществления латеральной диффузии липидных молекул, трансмембранного флип-флоп переноса липидов [15]. Изменение ФЛ-ФЛ соотношений в мембране эритроцитов способствует нарушению ионного и антиоксидантного гомеостаза, изменению конформации мембранноассоциированных транспортных белков. Известно, что активность и свойства транспортных АТФаз плазматических мембран в значительной степени определяются свойствами липидного матрикса, в который погружены молекулы фермента [2].

Согласно полученным данным, в мембране эритроцитов больных ГВ выявлено отчетливое угнетение активности мембраносвязанных ферментов по сравнению с аналогичными показателями у лиц контрольной группы. Установлено, что наиболее существенным изменениям подвергается активность одного из маркеров плазматической мембраны — она снижается почти в 4 раза у больных I группы ($p < 0,001$), в 3 — у больных III группы и более чем в 7 раз — у пациентов с абдоминально-почечным синдромом (рис. 3). Как известно, активность экто-5'-нук-

леотидазы регулируется состоянием текучести наружного слоя мембраны (ФХ/СМ). Подавление активности фермента, несомненно, обусловлено повышением ригидности наружного слоя мембраны в эритроцитах. Дефицит экто-5'-нуклеотидазы ведет к затруднению поступления нуклеотидов внутрь клетки, вследствие чего снижается ее аденилатный заряд, нарушается синтез белка, повышается агрегация эритроцитов [16]. Наблюдается понижение общей, Mg-зависимой и Са-АТФаз в 1,4; 1,3 и 1,7 раза соответственно. Несомненно, что снижению активности исследуемых АТФаз способствует окислительная деструкция основных классов фосфатидов-глицеридов и накопление ЛФХ. Последнее чревато переходом липидного бислоя в монослой, активацией проницаемости мембраны для катионов, солюбилизацией мембранносвязанных ферментов. Одним из механизмов модуляции ионтранспортирных систем может явиться и окисление сульфгидрильных групп в их активном центре, приводящее к изменению структуры центра [21].

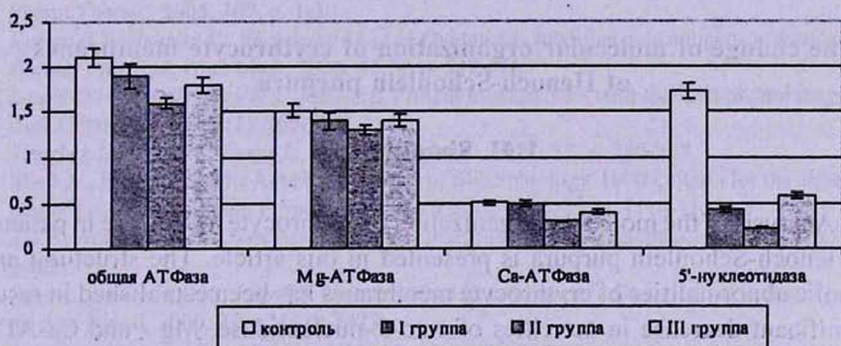


Рис. 3. Изменение активности мембранносвязанных ферментов в мембранах эритроцитов крови при ГВ (в микромолях P_i / мг белка)

Таким образом, изменение липидного спектра эритроцитарных мембран в совокупности с изменением профиля липид-липидных и липид-белковых взаимоотношений в эритроцитарных мембранах при болезни Шенлейна-Геноха закономерно приводят к утрате способности клеток регулировать ионный гомеостаз, нарушению деятельности мембранно-связанных ферментов, что в конечном итоге является причиной необратимых изменений структурно-метаболического статуса эритроцитов. Наблюдающиеся изменения являются молекулярной основой нарушения агрегабельности и деформабельности эритроцитов, приводя к серьезным гемореологическим и коагуляционным расстройствам.

Էրիթրոցիտային թաղանթների մոլեկուլային կազմավորման փոփոխությունը Շենլեյն-Հենոխի հիվանդության ժամանակ

L.Հ. Միմոնյան

Հոդվածում ներկայացված է հեմոռագիկ վասկուլիտով տառապող մարդկանց էրիթրոցիտային թաղանթների մոլեկուլային կազմավորման վերլուծությունը: Բացահայտված է էրիթրոցիտային թաղանթների կառուցվածքային և փոխանակային ստատուսի խախտում, որն արտահայտվում է էկտո-5'-նուկլեոտիդազի, Mg- and Ca-ԱՏՓ-ազների ակտիվության նշանակալի նվազմամբ և ֆոսֆատիդ գլիցերիդների բոլոր դասերի որակական և քանակական կազմի զգալի փոփոխությամբ:

Զննարկվում է մասնավոր փոփոխությունների դերը Շենլեյն-Հենոխի հիվանդության ախտածնության և հեմոռեոլոգիական խանգարումների զարգացման գործում:

The change of molecular organization of erythrocyte membranes at Henoch-Schonlein purpura

L.H. Simonyan

Analysis of the molecular organization of erythrocyte membrane in patients with Henoch-Schonlein purpura is presented in this article. The structural and metabolic abnormalities of erythrocyte membranes has been established in result of significant decrease in activities of ecto-5'-nucleotidase, Mg - and Ca-ATPases with simultaneous considerable change of qualitative and quantitative contents of all classes of phosphatides – glycerides.

The role of the above mentioned indices in the pathogenesis of Henoch-Schonlein purpura and formation of hemorheological disturbances is discussed.

Литература

1. *Васильева Е.М.* Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии (обзор литературы). Биомед. химия, 2005, т.51, 2, с. 118-126.
2. *Геннис С.Р.* Биомембраны. Молекулярная структура и функции. М., 1997.
3. *Дагбашян С.С., Пепанян А.А., Казарян П.А. и др.* Оценка липид-белковых и липид-липидных взаимоотношений при агрессивных неходжкинских лимфомах. Новое в гем. и трансфуз., Киев, 2006, 5, с.165-169.
4. *Зубаиров Д.М., Тиммербаев В.Н.* Функциональная концепция иницирования свертывания крови клеточными мембранами. Гематология и трансфузиология, 1991, 4, с. 5-9.
5. *Казарян П.А., Элоян Д.В.* Хроматографические методы. М., 1982.
6. *Мазурин А.В., Цымбал И.Н., Плахута Т.Г.* Геморрагический васкулит Шенлейна-

- Геноха (часть I). Тер. архив, 1996, 5, с. 84-87.
7. Новицкий В.В., Колосова М.В., Кравец Е.А. Структурно-метаболический статус и функциональные особенности эритроцитов при инсулинзависимом сахарном диабете у детей. Бюл. экспер. биол. мед., 1999, т.128, 9, с. 347-350.
 8. Ольшанский А.Я., Одинокова В.А., Квитко Н.Н. Эритроцит в тканевом и иммунном гомеостазе. Сов. мед., 1984, 11, с. 43-48.
 9. Прокопенко Л.Г., Сипливая Л.Е. Усп. физиол. наук, 1992, т. 23, 4, с. 89-106.
 10. Светашев В.И. Микротехника анализа липидов и ее использование. Автореф. дис. ... канд. хим. наук, Владивосток, 1973, 25 с.
 11. Яковлева Н.М. Клинико-патогенетические закономерности нарушений структурно-функциональных свойств эритроцитов и тромбоцитов при микрососудистых осложнениях сахарного диабета типа 1. Автореф. дис... канд. мед. наук, 2007, 29с.
 12. Ahsan H., Ali A., Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. Clin. Experim. Immunology, 2003, 131, 3, p. 398-404.
 13. Engelman B. Calcium homeostasis in human erythrocytes and its pathophysiological implications Biomed. Life Sci., 1991, 69, 4, p. 137-142.
 14. Fioretti E. et al. Spectrophotometric Assays for 5'-Nucleotidase. Using IMP, GMP and CMP as Substrates. The Italian Journal of Biochemistry, 1972, 21, 3, p. 103-112.
 15. Geldwerth D., Kuypers F.A., Butikafer P. et al. Transbilayer mobility and distribution of red cell phospholipids during storage. J. Clin. Invest., 1993, 92(1), p. 308-314.
 16. Hunsucker S.A. et al. The 5 β -nucleotides as regulators of nucleotide and drug metabolism. Pharm. Therap., 2005, 107, p. 1-30.
 17. Kurien B.T., Hensley K., Bachmann M. et al. Oxidatively modified auto antigens in autoimmune disease. Free Rad. Biol. Med., 2006, 41, 4, p. 549-556.
 18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Protein measurement with the folic phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193(1): 265-275.
 19. Muszbek L., Szabo T., Fesus L. Analyt. Biochem., 1977; 77, p. 286-288.
 20. Jills J.A., Bloch D.A. The American College of Rheumatology, 1990 Criteria for the classification of Henoch-Schonlein Purpura. Arthritis Reum., 1990, 33, p. 1114-1121.
 21. Xie Z., Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. Eur. J. Biochem., 2002, 269, p. 2434-2439.
 22. Yung L., Andrews D.A., Low P.S. Lysophosphatidic acid opens a Ca²⁺ channel in human erythrocytes. Blood, 2000, 95, p. 2420-2425.