

MODIFICĂRI ÎN VITEZA DE AGREGARE A TROMBOCITELOR ÎN HIPERGLICOPROTEINEMIE

L. Bukaresti, Maria Făgărășan, Eugenia Goina, Gabriela Sikó,
St. Hobai, A. László, M. Chiorean

În cursul cercetărilor noastre anterioare, începute acum 7 ani, am constatat că în hiperglicoproteinemia experimentală (1, 2, 3), precum și în diferite boli cu hiperglicoproteinemie (4, 5) se manifestă un efect anti-heparinic. Rezultatele noastre au fost în concordanță cu cele ale lui *Andersen* și *Godal* din 1977 (6), conform cărora alfa₁-glicoproteina acidă (alfa₁-GPA) izolată are in vitro un efect antiheparinic.

Andersen și *Eika* (7, 8) continuând cercetările au constatat în 1980 că alfa₁-GPA inhibă in vitro, agregarea plachetară indusă de trombină, adrenalină și colagen. Observațiile lor au fost în concordanță cu cele — tot in vitro — ale lui *Snyder* și *Coodley* din 1976 (9) și *Costello*, *Fiedel* și *Gewurtz* din 1979 (10) care au constatat același efect și în cazul agregării indusă de ADP.

Pornind de la aceste date, în continuarea cercetărilor noastre, ne-am propus urmărirea efectului in vivo, pe de o parte în cazul unei hiperglicoproteinemii experimentale, pe de altă parte pe material clinic.

Material și metodă

Hiperglicoproteinemie experimentală:

Experiențele au fost efectuate pe cobai masculi, cu o greutate între 500—700 g, repartizați în următoarele loturi:

Lotul martor (9 animale), fără nici un tratament.

Lotul cu inflamație experimentală (12 animale) a primit i.m. 0,2 ml/100 g corp soluție de 2% Coreine (preparat farmaceutic ce conține carrageenin) cu 46 ore înainte de sacrificare.

Materialul clinic

Determinările au fost efectuate pe 50 de bolnavi internați la Clinica de Anestezie și Terapie Intensivă. Întrucît în cadrul acestei lucrări — încă în scopuri orientative — ne-am propus urmărirea efectului numai în funcție de valoarea glicoproteinemiei, bolnavii au fost împărțiți, indiferent de natura bolii, în două subgrupe: hiperglicoproteinemie (polarograma < 101 mm) și hiperglicoproteinemie excesivă (polarograma > 100 mm).

Bolnavii au suferit de următoarele maladii:

Hiperglicoproteinemie sub 101 mm:

Intoxicații	3	bolnavi
Anemie feriprivă	2	„
Abdomen acut	1	bolnav
Peritonită	2	bolnavi
Insuficiență respiratorie	1	bolnav
Tromboflebită	1	„
Traumatism abdominal	1	„
Stare după operație	3	bolnavi
Hemoragie cerebrală	3	„
Hidrotorace stg.	1	bolnav
Pleurită	1	„
Ocluzie intestinală	2	bolnavi
Bronhopneumopatie	2	„
Stare comatoasă	1	bolnav
Colecistită	1	„
	25	bolnavi

Hiperglicoproteinemie peste 100 mm:

Ulcer	1	bolnav
Encefalopatie	1	„
Cancer	4	bolnavi
Intoxicații	5	„
Peritonită	1	bolnav
Stare după operație	2	bolnavi
Stare comatoasă	1	bolnav
Empiem pleural	1	„
Politraumatism	3	bolnavi
Diabet zaharat	1	bolnav
Poliartrită	1	„
Hemoragie cerebrală	1	„
Diateză hemoragică	1	„
Pancreatită necrotică	2	bolnavi
	25	bolnavi

Concentrația glicoproteinelor acidosolubile totale a fost estimată pe baza polarogramei filtratului obținut prin tratarea serului cu acid percloric (11). Din seromuroid (obținut prin precipitarea cu acid fosfowolframic a filtratului de ser tratat cu acid percloric) s-a determinat acidul sialic (12) din aceste glicoproteine.

Heparinemia a fost determinată pe baza reacției metacromatice pe care heparina o dă cu albastrul de toluidină (13).

Toleranța la heparină s-a determinat prin metoda obișnuită, amestecându-se 0,5 ml sînge citratat (0,2 ml soluție de citrat de sodiu 19⁰/_g și 9,8 ml sînge) preîncălzit la 37°C cu 0,5 ml soluție de heparină 0.2 μg/ml la fel preîncălzită (14).

Fibrinogenul s-a determinat prin metoda colorimetrică, *Ratnoff și colab.* (15), iar calciul total printr-o micrometodă (16) adaptată la titrarea colorimetrică automată.

Capacitatea antitripsinică (CAT) a serului a fost determinată după metoda descrisă de *Fritz și colab.* (17) (folosind ca substrat N-benzoil-arginin-p-nitranilidă: BAPNA, CAT se datorește în 90—95% alfa₁-antitripsinei [alfa₁-AT]).

Timpul de agregare a trombocitelor a fost măsurat prin înregistrarea grafică a variației survenite în transmisia luminii în cursul agregării plachetelor din plasmă, cu ajutorul spectrofotometrului (SPEKOL) echipat cu un dispozitiv de microtitrare modificat. Plasma bogată în plăcuțe s-a obținut prin centrifugarea singelui citratat (0,2 ml citrat de sodiu 19% și 9,8 ml sînge uman, respectiv 0,4 ml citrat de sodiu 19% și 9,6 ml sînge de cobai) timp de 5' la 1000 g. Ca agent de stimulare a agregării s-a folosit ADP 9,3 · 10⁻⁶ M conc. finală, pentru o determinare utilizîndu-se 0,3 ml ml plasmă. Agitarea lichidului s-a realizat cu ajutorul agitatorului magnetic (18).

Prelucrarea statistică s-a efectuat după metoda t Student.

Rezultate și discuții

Rezultatele obținute în cazul hiperglicoproteinemiei experimentale sînt cuprinse în tabelul nr. 1. Din datele tabelului reiese că la o creștere

Tabelul nr. 1

Lotul	Glicoproteinemie (Polarogramă mm)	Ac. sialic din sero-mucoid (mg %)	Fibrinogen (mg %)	Ca (mg %)	Timpul de agregare a trombocitelor
Martori (n=9)	31,1	5,76	245	9,87	16
Inflamație experimentală (n=12)	106,3	19,6	500	7,95	10,4
				<0,001	<0,02

de aproximativ 240% a glicoproteinemiei viteza de agregare a plachetelor crește cu aproximativ 35% (diferența este statistic semnificativă, $p < 0,02$). Cît privește ceilalți parametri, conținutul în acid sialic al glicoproteinelor acidosolubile a fost, conform așteptărilor, de asemenea crescut în inflamația experimentală, fibrinogenemia s-a dublat, iar calcemia totală a prezentat o ușoară, dar statistic semnificativă descreștere ($p < 0,001$). Această observație este în concordanță cu unele date după care fibrinogenul poate micșora nivelul calcemiei (19).

Urmărind rezultatele obținute pe materialul clinic — cuprinse în tabelul nr. 2 — se constată că la o creștere de aproximativ 57% a glicoproteinemiei de la prima grupă de bolnavi (cu hiperglicoproteinemie), la cea de a doua (cu hiperglicoproteinemie excesivă) viteza de agregare a

Tabelul nr. 2

Grupa	Glicoproteinemie (Polarogramă mm)	Ac. cialic din sero-mucoid mg %	CAT m UI ml	Fibrinogen mg %	Ca mg %	Toler. la hep. sec.	Hep. µg/ml	Timpul de agregare a trombocitelor sec.
Hiperglicoproteinemie (n=25)	77,8	12,6	1237	373	8,88	226	1,83	21,1
Hiperglicoproteinemie excesivă (n=25)	122,5	16	1288	473	8,95	273	1,85	14,7
P	<0,001	<0,05		>0,05		>0,2		<0,05

plachetelor creşte cu aproximativ 30% (diferenţa este statistic semnificativă $p < 0,05$). Conţinutul în acid sialic al glicoproteinelor acidosolubile a crescut, fibrinogenemia de asemenea, dar într-o măsură mai mică (aproximativ 26%), calcemia nu a prezentat modificări.

Toleranţa la heparină şi heparinemia dozată pe cale chimică nu s-au modificat, deşi grupa cu hiperglicoproteinemie excesivă a primit heparină de mai multe ori decât prima grupă (efect antiheparinic) (5). CAT de asemenea nu s-a modificat, fiind în concordanţă cu rezultatele noastre anterioare, după care CAT nu creşte în urma heparinizării dacă concomitent creşte şi glicoproteinemia (3).

Constatarea esenţială după cele două serii de studii (experimentale şi pe materialul clinic) este că augmentarea concentraţiei glicoproteinelor acidosolubile este însoţită de creşterea vitezei de agregare plachetară. Fapt care este în contradicţie cu cele observate in vitro de autorii sus amintiţi (7, 8, 9, 10) care au constatat un efect inhibitor al alfa₁ GPA asupra vitezei de agregare a trombocitelor. Fireşte, în primul rând trebuie să pornim de la faptul că observaţia autorilor amintiţi se bazează pe experienţe efectuate in vitro în condiţii artificiale, iar experienţele noastre au fost efectuate după anumite schimbări patologice in vivo ale organismului animal sau uman.

Luind în considerare că în asemenea condiţii se manifestă şi efectul altor factori de reglare, am putut aştepta un răspuns mult mai complex. Pe de altă parte, Andersen şi Eika (7), cercetind efectul alfa₁-GPA asupra agregării trombocitare au constatat că glicoproteina respectivă atenuază efectul inhibitor al heparinei şi AT-III asupra fenomenului. Constatarea a fost în concordanţă cu cea anterioară a cercetătorilor (6), după care alfa₁-GPA are un efect antiheparinic in vitro, fapt constatat şi de noi in vivo (5).

S-a dovedit pe de altă parte că trombina (puternic inhibată de heparină + AT-III) poate provoca agregarea plachetară în concentraţie mult mai redusă decât cea necesară transformării fibrinogenului în fibrină (20).

Trebuie să amintim şi faptul că experienţele autorilor amintiţi (7, 8, 9, 10) au fost efectuate cu alfa₁ GPA izolată şi purificată, iar noi am de-

terminat glicoproteinele acidosolubile totale. Dar se cunoaște că alfa₁-GPA este componentul major al acestor glicoproteine (aproximativ 80%).

Desigur, la interpretarea rezultatelor nu trebuie pierdut din vedere nici acea posibilitate că o hiperglicoproteinemie excesivă nu este cauza fenomenului constatat ci numai o modificare coexistentă determinată de cauza adevărată (cauza legată de procesul morbid).

Cu toate aceste eventualități, faptul că modificări în viteza agregării plachetare au fost constatate în hiperglicoproteinemie, stare care poate să apară în multe afecțiuni (cum sînt boli cu caracter inflamator, distrucții tisulare sau de proliferare malignă), justifică continuarea acestor cercetări.

Bibliografie

1. Bukaresti L. și colab.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg.-Mureș (1981), 7, 173; 2. Bukaresti L. și colab.: Ibidem (1982), 8, 156; 3. Bukaresti L. și colab.: Revista medicală (1983), 29, 49; 4. Bukaresti L. și colab.: Sesiunea științifică anuală de valorificare a cercetării medicale, Tg.-Mureș (1983); 5. Bukaresti L. și colab.: Revista medicală (1986), 32, 65; 6. Andersen P., Godal H. C.: Hemostatis (1977), 6, 339; 7. Andersen P., Eika C.: Scand. J. Haematol. (1980), 24, 365; 8. Andersen P., Eika C.: Scand. J. Haematol. (1980), 25, 202; 9. Snyder S., Coodley E. L.: Arch. Intern. Med. (1976), 136, 778; 10. Costello N., Fiedel B. A., Gewurtz H.: Nature (1979), 281, 1677; 11. Bukaresti L. și colab.: Revista medicală (1981), 27, 81; 12. Aminoff D.: Biochem. J. (1961), 81, 394; 13. Jaques I. B., Bell H. J.: in Methods of Biochemical Analysis, vol. VII, red. Glick D.: Interscience Publ. Ltd. London, 1959, 253; 14. Manta I., Cucuianu M., Benga G., Hodârnu A.: Metode biochimice în laboratorul clinic. Ed. Dacia Cluj-Napoca, 1976, 348; 15. Ratnoff O. D., Hanzie C. J., Astrup T.: J. Clin. Lab. Invest. (1965), 17, 37; 16. Siegmund P., Duke S.: Z. Physiol. Chem. (1960), 320, 149; 17. Fritz H., Trautscheld J., Werle E.: Methoden der enzymatischen Analyse, vol. II red. Bergmeyer H. V. Akad. Verlag. Berlin, 1970, 1021; 18. Făgărășan Maria, Kovács A., Trimbițaș D.: Simpozionul de endocrinologie „Sterilitatea endocrină”, 6—7 sept. 1985, Tg.-Mureș, volum de rezumate; 19. Jackson C., Nemerson Y.: Ann. Rev. Biochem. (1980), 49, 792; 20. Bagdy D.: A vérvalvadás orvosi biokémiája. Medicina Budapest, 1980, 90—92.

L. Bukaresti, Maria Făgărășan, Eugenia Goina, Gabriela Sikó, Șt. Hobai,
A. László, M. Chiorean

MODIFICATIONS IN THE AGGREGATION RATE OF THROMBOCYTES IN HYPERGLYCOPROTEINAEMIA

On the one hand the researches were carried out in experimental hyperglycoproteinaemia /provoked in guinea-pigs by an inflammatory process/, on the other hand on a clinical material of various diseases with hyperglycoproteinaemia.

In experimental hyperglycoproteinaemia the authors determined glycoproteinaemia estimated according to the polarogram of the filtrate of serum de-

proteinized with HClO_4 , sialic acid from these glycoproteins, fibrinogenaemia, calcaemia, type of thrombocyte aggregation. In addition to the above parameters, in patients they also determined hepaninaemia, heparin tolerance, antitrypsin capacity of the serum.

The main ascertainment of the paper is that both in experimental hyperglycoproteinaemia and in excessive hyperglycoproteinaemia in the clinical material the aggregation rate of platelets increases
