

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

СРЕДНИЙ ОБЪЕМ ТРОМБОЦИТОВ: ВЗАИМОСВЯЗИ С АГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ТРОМБОЦИТОВ И УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ПЬ-3А И ИВ

*С.Г. Хаспекова¹, И.Т. Зюряев¹, В.В. Якушкин¹, Я.А. Наймушин¹,
О.В. Сироткина^{2,3}, Н.О. Зайцева², М.Я. Руда¹, А.В. Мазуров^{1*}*

¹ФГБУ “Российский кардиологический научно-производственный комплекс”
Минздрава России, 121552 Москва, 3-я Черепковская, 15а;
тел.: + 7 (495) 4146735; эл. почта: avmazurov@list.ru

²ФГБУ “Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова”,
Гатчина, Ленинградская область

³ГБОУ ВПО “Северо-Западный государственный медицинский университет
им. И.И. Мечникова” Минздрава России, Санкт-Петербург.

Повышенный средний объем тромбоцитов (СОТ) является независимым фактором риска тромботических событий у больных с сердечно-сосудистыми патологиями. В настоящей работе изучали взаимосвязи СОТ с агрегационной активностью тромбоцитов и содержанием гликопротеина (ГП) ПЬ-3А (α ПЬ/β3 интегрин, рецептор фибриногена) и ГП ИВ (рецептор фактора Виллебранда). Исследования проводили в группе здоровых добровольцев (n=38) и группе больных с острым коронарным синдромом (ОКС, n=116). У больных кровь собирали в 1, 3-5 и 8-12 сутки после развития ОКС. Все больные получали в качестве антиагрегантной терапии ацетилсалициловую кислоту (АСК, ингибитор синтеза тромбоксана А2) и большинство – клопидогрел (антагонист рецептора ADP), за исключением части больных (n=44) в 1 сутки, которые до первого сбора крови не принимали клопидогрел. Агрегацию тромбоцитов у добровольцев стимулировали 1,25, 2,5, 5, и 20 мкМ ADP, а у больных - 5 и 20 мкМ ADP. Количество ГП ПЬ-3А и ГП ИВ на поверхности тромбоцитов измеряли с помощью ¹²⁵I-меченных моноклональных антител. Генетические полиморфизмы ГП ПЬ-3А и ГП ИВ определяли у больных с ОКС. Достоверные корреляции между СОТ и уровнем агрегации тромбоцитов были выявлены у здоровых доноров при дозах ADP 1,25 и 2,5 мкМ (коэффициенты корреляции (r) - 0,396 и 0,373, p<0,05), а при дозах 5 и 20 мкМ эти взаимосвязи не достигали достоверного уровня (r - 0,279 и 0,205, p>0,05). Корреляции между СОТ и уровнем агрегации наблюдали в 1 сутки ОКС в подгруппе больных, которые получили АСК, но еще не начали прием клопидогрела (r - 0,526, p<0,001 и 0,368, p<0,05 для 5 и 20 мкМ ADP соответственно). Взаимосвязей между этими параметрами не было отмечено на фоне совместного приема АСК и клопидогрела. Сильные прямые корреляции между СОТ и количеством ГП ПЬ-3А и ГП ИВ были зарегистрированы как у здоровых доноров, так и у больных с ОКС (во всех временных точках), – r от 0,439 до 0,647 (для всех корреляций p≤0,001). Генетические полиморфизмы ГП ПЬ-3А (ГП 3А Leu33Pro) и ГП ИВ ((-5)T/C (Kozak) и Thr145Met), определяемые у больных с ОКС, не влияли на содержание соответствующих гликопротеинов. Полученные данные указывают на то, что высокие показатели СОТ коррелируют с увеличенной агрегационной активностью тромбоцитов и повышенной экспрессией ГП ПЬ-3А и ГП ИВ.

Ключевые слова: средний объем тромбоцитов, агрегация тромбоцитов, гликопротеин ПЬ-3А, гликопротеин ИВ, острый коронарный синдром.

* - адресат для переписки

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБЪЕМА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

ВВЕДЕНИЕ. Средний объем тромбоцитов (СОТ) – это стандартный показатель, характеризующий размер тромбоцитов и определяемый при проведении анализов крови в современных гематологических анализаторах. СОТ может варьировать в достаточно значительных пределах – приблизительно от 6 до 11 фл. В ряде крупных клинических исследований и в мета-анализах было показано, что повышенный СОТ является независимым фактором риска тромботических событий у больных с сердечно-сосудистыми патологиями [1-3].

Исследования гетерогенности тромбоцитов, проводимые при их фракционировании из образцов крови человека и животных, показали, что субпопуляции крупных тромбоцитов (т.е. с большим объемом) обладают более высоким тромбогенным потенциалом – они интенсивнее агрегируют, содержат большее количество секреторных гранул и секретируют больше протромбогенных соединений, таких как ADP и тромбоксан A₂ [4-6]. Однако, влияние межиндивидуальных вариаций размера тромбоцитов, т.е. СОТ, на функциональную активность тромбоцитов и, в частности на их способность к агрегации, остается практически неизученным.

Основные функциональные реакции тромбоцитов – агрегация, адгезия, взаимодействие с другими клетками – реализуются при участии различных молекул клеточной адгезии. Взаимодействие гликопротеина (ГП) IIb-IIIa (α IIb/ β 3 интегрин) с фибриногеном приводит к образованию молекулярных связей между активированными тромбоцитами в процессе их агрегации. Связывание ГП IIb с фактором Виллебранда инициирует адгезию и агрегацию тромбоцитов в условиях высоких скоростей сдвига. Рецепторы коллагена, ГП VI и α 2/ β 1 интегрин, вместе с ГП IIb обеспечивают адгезию тромбоцитов к поврежденным участкам сосудистой стенки. ГП IIb-IIIa, ГП IIb, P-селектин и ряд других рецепторов участвуют в связывании тромбоцитов с белыми клетками крови (см. обзоры [7-9]).

Количество молекул клеточной адгезии на поверхности тромбоцитов может значительно варьировать как у здоровых лиц, так и у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями – от двукратных вариаций для ГП IIb-IIIa [10-16] и ГП IIb [12, 13, 15, 17-19], до 5-кратных – для ГП VI [20, 21] и 10-кратных – для α 2/ β 1 интегрин [16, 22, 23]. Взаимосвязи между содержанием этих молекул и интенсивностью опосредуемых ими тромбоцитарных реакций были продемонстрированы для ГП IIb-IIIa [14, 15], ГП VI [20, 21] и α 2/ β 1 интегрин [22, 24]. Эти данные указывают на то, что уровень этих белков может быть важным индикатором активности тромбоцитов. Размер тромбоцитов – один из факторов, который может влиять на общее содержание молекул клеточной адгезии на плазматической мембране. Исследования тромбоцитов, проводимые в отдельных образцах крови с помощью проточной цитофлуориметрии, показали наличие корреляции между размером тромбоцитов и количеством ГП IIb-IIIa и ГП IIb [25-28]. В то же время межиндивидуальные различия в количестве адгезивных рецепторов могут зависеть не только от размера тромбоцитов (т.е. СОТ), но и от генетически детерминированных полиморфизмов этих белков. Kupuski и соавт. [16] обнаружили значимые корреляции между количеством ГП IIb-IIIa и СОТ и не выявили зависимости экспрессии белка от ГП IIIa Leu33Pro полиморфизма. В этом же исследовании, при анализе факторов, влияющих на содержание α 2/ β 1 интегрин, была отмечена лишь умеренная взаимосвязь с размером тромбоцитов, но сильное влияние 807T/C аллельных вариантов α 2-цепи. В других работах было также показано отсутствие

эффектов ГП IIIa Leu33Pro полиморфизма [12-14, 29, 30] и влияние 807T/C полиморфизма α 2-цепи [12, 23] на уровень экспрессии соответствующих белков. Вклад генетической составляющей был зафиксирован для ГП VI – количество этого рецептора было снижено у носителей Pro219 аллели (замена Ser219Pro) [20, 31]. Afshar-Kharghan и соавт. [17] представили данные о влиянии генетического полиморфизма на экспрессию ГП Ib – наличие минорной (-5)C аллели ((-5)T/C (*Kozak*) полиморфизм), которая ассоциирована с повышенным уровнем этого гликопротеина. Однако результаты этого исследования не были подтверждены другими авторами [12, 18, 19].

В настоящей работе мы изучали влияние индивидуальных вариаций COT на агрегационную активность тромбоцитов и содержание ГП IIb-IIIa и ГП Ib. Исследования проводили в группе здоровых добровольцев и группе больных с острым коронарным синдромом (ОКС). Кроме того у больных с ОКС проводили определение генетических полиморфизмов ГП IIb-IIIa и ГП Ib и оценивали их возможные ассоциации с уровнем экспрессии этих белков.

МЕТОДИКА.

Здоровые добровольцы и больные с острым коронарным синдромом (ОКС). Группу здоровых добровольцев составили 38 доноров (19 мужчин, возраст – 41 ± 14 года) без клинических признаков сердечно-сосудистых, гематологических и других заболеваний. Все добровольцы не принимали лекарств, по крайней мере, в течение 2 недель перед сбором крови.

Группа из 116 больных с ОКС (81 мужчина, возраст – 59 ± 11 лет) состояла из 17 больных с нестабильной стенокардией и 99 больных с острым инфарктом миокарда, которые были госпитализированы в Российский кардиологический научно-производственный комплекс с ноября 2009 г. по ноябрь 2012 г. Кровь у больных собирали в 1, 3-5 и 8-12 сутки после развития ОКС. В большинстве случаев больные получали двойную антитромбоцитарную терапию – ацетилсалициловую кислоту (АСК, нагрузочная доза – 300 мг, затем 100 мг/сутки) в сочетании с клопидогрелом (нагрузочная доза 300-600 мг, затем 75-150 мг в сутки). Исключение составили 44 пациента в 1 сутки ОКС, которые до первого взятия крови еще не начали прием клопидогрела. Части больных ($n=21$) в некоторых временных точках не проводили анализы в связи с введением антагониста ГП IIb-IIIa Монафрама. Кровь не собирали в течение 6 суток после введения препарата, требующихся для окончания его антиагрегационного действия [32]. Часть больных ($n = 20$) была недоступна на 8-12 сутки в связи с ранней выпиской. Один больной был исключён из исследования в связи с внутричерепным кровотечением на 3 сутки после поступления и один больной умер на 2 сутки после поступления. В конечном итоге из 116 пациентов, включенных в исследование, измерения тестируемых параметров во всех 3 временных точках было проведено у 55, в двух – у 54, и в одной – у 7 пациентов.

У здоровых добровольцев и больных с ОКС было получено информированное согласие на участие в исследовании, а исследование было одобрено этическим комитетом Российского кардиологического научно-производственного комплекса.

Сбор крови и подготовка образцов для анализа. Кровь собирали в 3,8% цитрат натрия в соотношении кровь/антикоагулянт 9/1. Обогащённую тромбоцитами плазму (ОТП) получали, центрифугируя кровь при 180 g в течение 10 мин. при комнатной температуре. После отбора ОТП плазму без тромбоцитов получали путем дальнейшего центрифугирования крови при 1500 g в течение 15 мин при комнатной температуре. После отбора ОТП

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБЪЕМА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

и плазмы к осадку, содержащему эритроциты и лейкоциты добавляли 1/10 объема 5% ЭДТА и хранили его при -70°C для последующего определения генетических полиморфизмов ГП IIb-IIIa и ГП Ib. Определение COT, измерения агрегации и определения количества ГП IIb-IIIa и ГП Ib проводили в течение 1-2 ч после взятия крови.

Определение среднего объема тромбоцитов (COT). COT и количество тромбоцитов в цельной крови и в ОТП определяли в гематологическом анализаторе Abacus Junior B (“Diatron Ltd.”, Австрия). Нами не было обнаружено существенных различий между значениями COT, определяемыми в крови и ОТП. Средние значения COT в ОТП составили $102,8 \pm 4,3\%$ и $100,2 \pm 4,3\%$ от 100% значений, определяемых в цельной крови у здоровых добровольцев и у больных с ОКК соответственно. В связи с тем, что измерения агрегации тромбоцитов и количества ГП IIb-IIIa и ГП Ib проводили в ОТП (см. ниже) при анализе результатов использовали значения COT, определяемые в ОТП.

Измерения агрегации тромбоцитов. ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов регистрировали в ОТП стандартным турбидиметрическим методом, анализируя изменения светопропускания суспензии (Т%). Исследования проводили в анализаторе агрегации БИОЛА (БИОЛА, Россия) при 37°C и перемешивании со скоростью 800 об/мин. У здоровых добровольцев использовали ADP в конечной концентрации 1,25, 2,5, 5 и 20 мкМ, а у больных с ОКК – 5 и 20 мкМ. ADP добавляли к ОТП через 30 с после начала регистрации светопропускания и проводили измерения в течение 4,5 мин после добавления индуктора. При анализе агрегационных кривых определяли максимальный уровень агрегации (Т% макс.). Применение у больных только высоких концентраций ADP (5 и 20 мкМ) было обусловлено получением ими антитромбоцитарных препаратов (АСК и клопидогрел, см. выше) существенно понижающих уровни агрегационных ответов. В 3-5 и 8-12 сутки в статистический анализ не включали показатели агрегации 20 из 116 больных, которые вместо стандартной поддерживающей дозы клопидогрела (75 мг в сутки) получали двойную дозировку (150 мг в сутки).

Измерение количества ГП IIb-IIIa и ГП Ib. Содержание ГП IIb-IIIa и ГП Ib на поверхности тромбоцитов определяли, как описано ранее [14, 15], используя ^{125}I -меченые моноклональные антитела против этих белков. Содержание тромбоцитов в ОТП доводили аутологичной плазмой до $2,5 \times 10^8$ на 1 мл, а при более низкой концентрации тромбоцитов использовали неразведенную ОТП. Для определения ГП IIb-IIIa применяли комплекс-специфическое антитело CRC64 [14], а для определения ГП Ib – антитело VM16d [33]. ^{125}I -меченые антитела добавляли к ОТП в конечной концентрации 10 мкг/мл в отсутствие или в присутствии 20-кратного избытка немеченых антител (для измерения общего и неспецифического связывания соответственно). Инкубацию с антителами проводили в течение 30 мин при 37°C . После окончания инкубации связанную с тромбоцитами и свободную метку разделяли центрифугированием ОТП через раствор 20% сахарозы. Специфическое связывание оценивали, как общее минус неспецифическое. Содержание гликопротеинов рассчитывали как количество молекул связанного антитела на 1 тромбоцит.

Определение генетических вариантов ГП IIb-IIIa и ГП Ib. ДНК из образцов крови выделяли с помощью наборов “Проба Репид Генетика” (“ДНК-Технология”, Россия). Выделенную ДНК хранили при -20°C . Генетические варианты ГП IIIa Leu33Pro определяли с помощью ПЦР

в режиме “реального времени”, используя набор “КардиоГенетика Тромбофилия” (“ДНК-Технология”), на детектирующем амплификаторе “ДТ-96” (“ДНК-Технология”). Для определения полиморфизма GP Ib Thr145Met использовали набор для аллель-специфичной ПЦР “SNP-экспресс кардиогенетика” (ООО НПФ “Литех”, Россия). Идентификацию полиморфизма T/C в -5 позиции гена GP Ib (“Kozak” полиморфизм) проводили, как описано ранее [34], используя ПЦР и последующий анализ фрагментов, получаемых при действии рестриктазы Ava II (“Fermentas”, Литва).

Статистика. Статистический анализ проводили с помощью программы “Statistica 10.0 for Windows”. Параметрическую статистику применяли при $n > 100$ или в тех случаях, когда распределение переменных удовлетворяло критериям нормальности (тест Шапиро-Вилкса). Во всех других случаях использовали непараметрические тесты: Манна-Уитни и Крускала-Уоллеса – для сравнения двух и нескольких независимых переменных, ANOVA по Фридману – для сравнения повторно измеряемых переменных, Ньюмена-Кейлса для попарного определения различий между множественными переменными, Спирмана – для оценки корреляционных взаимосвязей. Данные представляли как средние \pm стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Средний объём тромбоцитов (СОТ) у здоровых добровольцев и больных с ОКС. Средние значения и вариации СОТ представлены в таблице 1. У здоровых добровольцев СОТ варьировал от 6,0 до 11,0 фл, а у больных с ОКС – от 6,5 до 11,0 фл. Мы не обнаружили достоверных различий между средними значениями СОТ у здоровых доноров и пациентов с ОКС. Не было зарегистрировано различий и между средними значениями СОТ при его определении в разные сроки после развития ОКС (1, 3-5 и 8-12 сутки). Анализ СОТ у пациентов с помощью статистических методов, применяемых для повторных измерений (тест ANOVA по Фридману), также не выявил достоверных изменений этого показателя ($p > 0,05$, для 55 пациентов, у которых измерения проводилось во всех трёх временных точках). Эти результаты позволили нам использовать для некоторых статистических анализов индивидуальные средние значения СОТ для каждого пациента.

Агрегация тромбоцитов у здоровых добровольцев и больных с ОКС. Агрегацию тромбоцитов у здоровых добровольцев индуцировали 1,25, 2,5, 5 и 20 мкМ ADP. Средние значения уровня агрегации, которые возрастали с увеличением концентрации ADP, представлены на рисунке 1А. У больных с ОКС использовали две дозировки ADP – 5 и 20 мкМ. Средние уровни агрегации в 1, 3-5 и 8-12 сутки после развития ОКС представлены на рисунке 1Б. В 1 сутки учитывались анализы, проведенные у больных, которые уже получили АСК (ингибитор синтеза тромбосана А2), но ещё не начали прием клопидогрела (антагонист P2Y₁₂ рецептора ADP). Показатели агрегации у больных, уже получивших нагрузочную дозу клопидогрела, не анализировали в связи с существенной вариабельностью эффектов этого препарата в зависимости от времени между его первым приемом и взятием крови, которое у разных больных составляло от 0,5 до 10 ч. Как видно из рисунка 1Б на 3-5 сутки, т.е. после нескольких дней применения клопидогрела в дополнении к АСК происходило значительное (на 40-50%) снижение агрегации в ответ на обе дозы ADP. В дальнейшем – на 8-12 сутки показатели агрегации уже не изменялись.

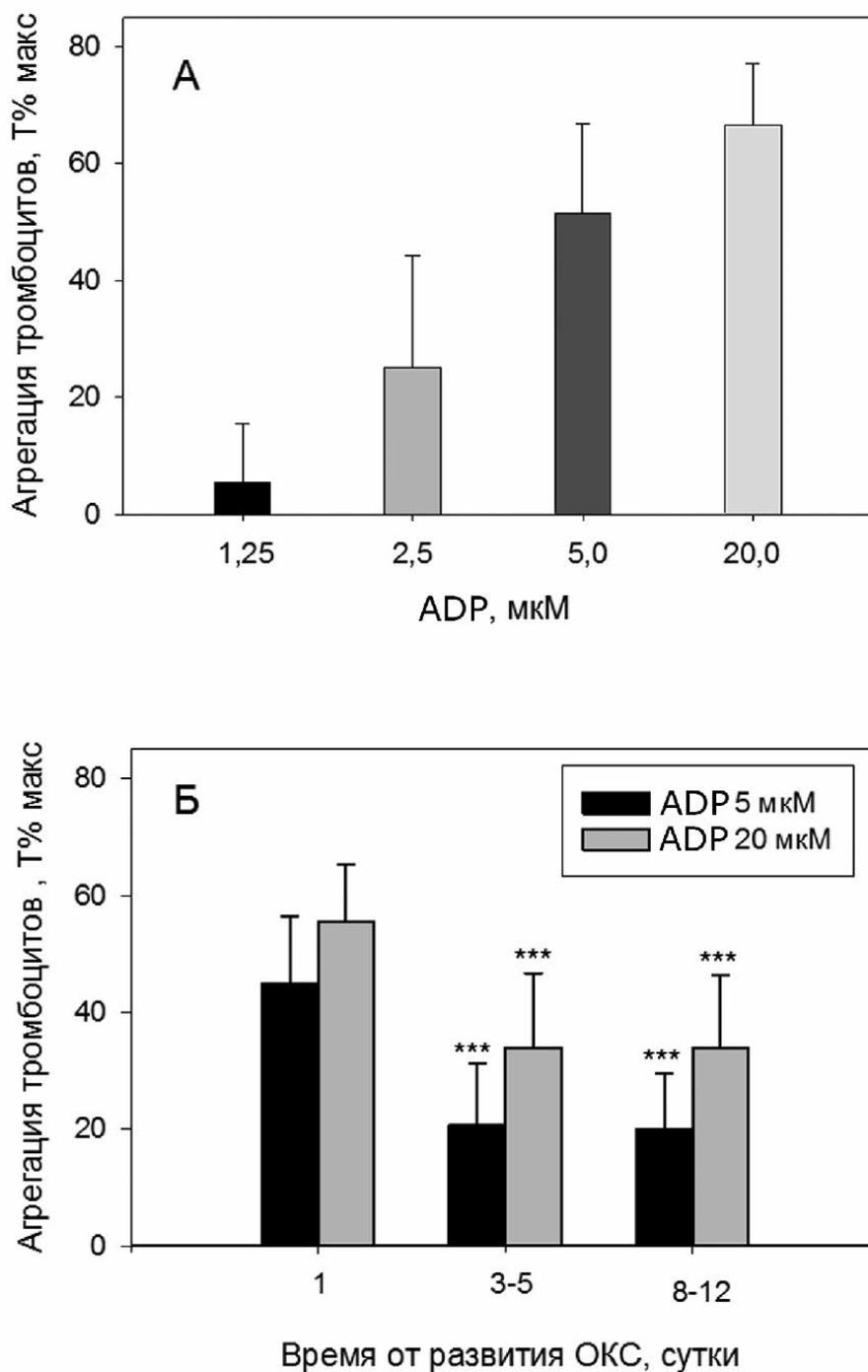


Рисунок 1.

Агрегация тромбоцитов у здоровых доноров (А) и больных с ОКС в разные сроки развития заболевания и на фоне разной антитромбоцитарной терапии (Б). (А) Максимальные уровни агрегации, индуцированной 1,25, 2,5, 5, и 20 мкМ ADP определяли у здоровых добровольцев (n = 38). Представлены средние ± стандартные отклонения. (Б) Максимальные уровни агрегации, индуцированной 5 и 20 мкМ ADP (черные и серые столбцы соответственно) определяли у больных с ОКС в 1 сутки (АСК, без клопидогрела, n = 43), 3-5 сутки (АСК + клопидогрел, n = 71) и 8-12 сутки (АСК + клопидогрел, n = 70) после развития заболевания. Представлены средние ± стандартные отклонения. *** - p<0,001 - Достоверность отличий от 1 суток (АСК без клопидогрела).

Таблица 1. СОТ у больных с ОКС и здоровых доноров.

	ОКС, среднее* (n = 116)	ОКС, 1 сутки (n = 107)	ОКС, 3-5 сутки (n = 82)	ОКС, 8-12 сутки (n = 89)	Здоровые доноры (n = 38)
СОТ, фл	8,06±0,80 (6,7–10,6)	7,98±0,86 (6,5–10,6)	8,12±0,90 (6,6–10,5)	8,04±0,81 (6,6–11,0)	7,94±1,00 (6,0–11,0)

Примечание. Представлены средние ± стандартные отклонения, а также минимальные и максимальные значения (в скобках). Различия между больными с ОКС и здоровыми донорами, и различия между разными временными точками у больных с ОКС недостоверны. * - при анализе использовали индивидуальные средние значения для каждого больного, рассчитанные на основе показателей, измеренных в разных временных точках (аналогично в таблицах 3-5 и на рисунке 3).

Агрегация тромбоцитов и средний объём тромбоцитов (СОТ). Как у здоровых добровольцев, так и у больных с ОКС наблюдались умеренные корреляционные взаимосвязи между показателями агрегации и СОТ (рис. 2 и табл. 2). У добровольцев достоверные корреляции были зарегистрированы для 1,25 и 2,5 мкМ АDP, а при более высоких концентрациях АDP (5 и 20 мкМ) эти тенденции не достигали достоверного уровня. У больных с ОКС достоверные взаимосвязи между уровнем агрегации и СОТ были зарегистрированы в 1 сутки заболевания в подгруппе больных, которые уже получили АСК, но еще не начали прием клопидогрел. В другие временные точки (3-5 и 8-12 сутки), когда все больные получали не только АСК, но и клопидогрел подобных корреляций не наблюдалось.

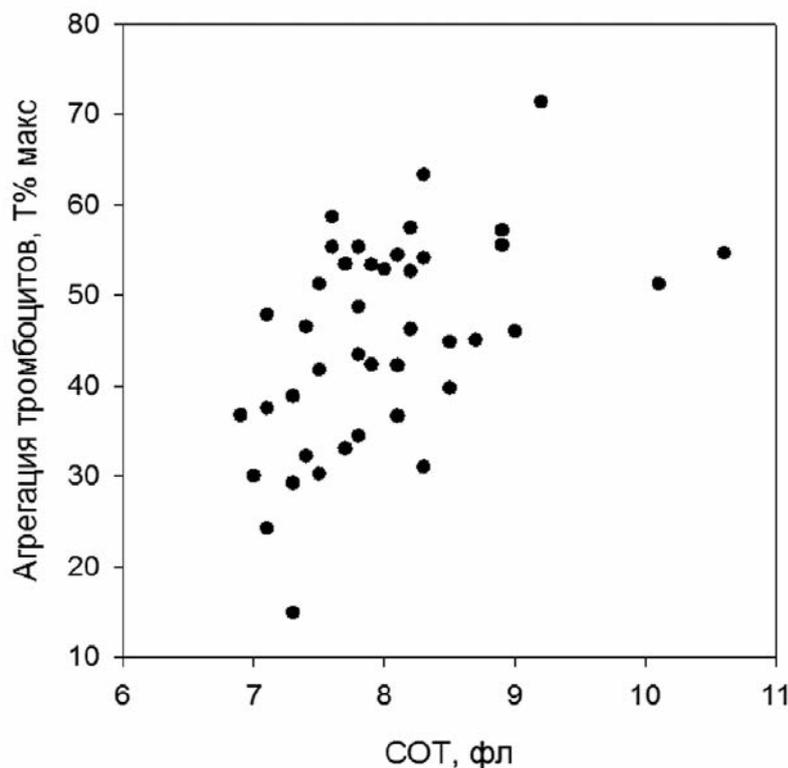


Рисунок 2.

Корреляция между максимальным уровнем агрегации, индуцированной 5 мкМ АDP и СОТ у больных с ОКС (1 сутки, АСК, без клопидогрела, n = 43).

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБЪЕМА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

Таблица 2. Взаимосвязи между агрегацией тромбоцитов и COT у больных с ОКС и здоровых доноров.

ADP, мкМ	Коэффициенты корреляции между максимальной агрегацией и COT			
	20	5	2,5	1,25
ОКС, 1 сутки ¹ (n = 44)	0,368*	0,526***	-	-
ОКС, 3-5 сутки ² (n = 71)	- 0,105	- 0,063	-	-
ОКС, 8-12 сутки ² (n = 69)	- 0,054	- 0,151	-	-
Здоровые доноры (n = 38)	0,205	0,279	0,373*	0,396*

Примечание: 1 - только АСК; 2 - АСК + клопидогрел. Агрегацию, индуцированную 2,5 и 1,25 мкМ ADP у больных с ОКС не определяли. Достоверности корреляций: * - $p < 0,05$; *** - $p < 0,001$.

Содержание ГП IIb-IIIa и ГП Ib у здоровых добровольцев и больных с ОКС. Средние значения и вариации содержания ГП IIb-IIIa и ГП Ib представлены в таблице 3. У здоровых добровольцев и у больных с ОКС наблюдались приблизительно 2- и 2,5-кратные вариации в содержании ГП IIb-IIIa и ГП Ib соответственно. Мы не обнаружили достоверных различий содержания обоих гликопротеинов у здоровых доноров и пациентов с ОКС. Также мы не зарегистрировали различий между средними уровнями экспрессии обоих гликопротеинов в разные сроки после развития ОКС (1, 3-5 и 8-12 сутки) и не выявили достоверных изменений этих показателей при статистическом анализе повторных измерений (тест ANOVA по Фридману, $p > 0,05$, для 55 пациентов, у которых измерения проводилось во всех трёх временных точках). Как и в случае с COT эти данные позволили нам использовать для некоторых статистических анализов индивидуальные средние значения экспрессии ГП IIb-IIIa и ГП Ib для каждого пациента.

Таблица 3. Содержание ГП IIb-IIIa и ГП Ib у больных с ОКС и здоровых доноров.

	ОКС, среднее* (n = 116)	ОКС, 1 сутки (n = 107)	ОКС, 3-5 сутки (n = 82)	ОКС, 8-12 сутки (n = 89)	Здоровые доноры (n = 38)
ГП IIb-IIIa, 10 ³ на 1 тромбоцит	48,8±7,3 (35,4–73,0)	49,4±7,5 (35,8–73,8)	48,8±7,1 (36,1–69,2)	48,5±8,3 (33,6–72,2)	47,6±7,4 (31,9–67,1)
ГП Ib, 10 ³ на 1 тромбоцит	27,3±5,3 (15,9–40,1)	27,3±5,4 (16,6–42,3)	27,0±5,4 (15,0–39,6)	27,4±5,5 (16,2–42,4)	25,4±5,0 (15,3–39,7)

Содержание ГП IIb-IIIa и ГП Ib и средний объём тромбоцитов (COT). Как у здоровых добровольцев, так и у больных с ОКС были зарегистрированы достоверные и сильные корреляционные взаимосвязи между содержанием ГП IIb-IIIa и ГП Ib и COT – коэффициенты корреляции (r) от 0,439 до 0,647 (табл. 4). Также в обеих группах наблюдалась значимая корреляция между содержанием обоих гликопротеинов – r от 0,516 до 0,583 (рис. 3). У больных зарегистрированные корреляции наблюдались во всех временных точках – 1, 3-5 и 8-12 сутки после развития ОКС.

Таблица 4. Корреляции между содержанием ГП IIb-IIIa и СОТ, содержанием ГП Ib и СОТ, и содержанием ГП IIb-IIIa и ГП Ib у больных с ОКС и здоровых доноров.

	ОКС среднее* (n = 116)	ОКС 1 сутки (n = 107)	ОКС 3-5 сутки (n = 82)	ОКС 8-12 сутки (n = 89)	Здоровые доноры (n = 38)
Коэффициенты корреляции					
ГП IIb-IIIa / СОТ	0,642	0,601	0,631	0,647	0,639
ГП Ib / СОТ	0,510	0,492	0,439	0,508	0,527
ГП IIb-IIIa / ГП Ib	0,515	0,526	0,566	0,504	0,583

Примечание. Достоверность корреляций везде - $p \leq 0,001$.

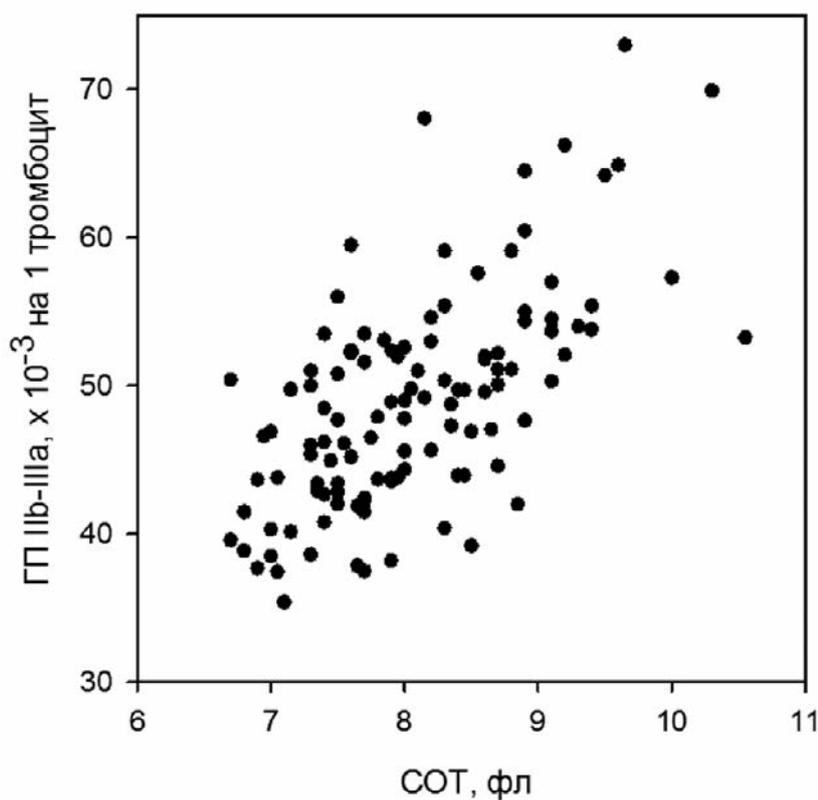


Рисунок 3.

Корреляция между содержанием ГП IIb-IIIa и СОТ у больных с ОКС.
Анализ индивидуальных средних значений (n = 116).

Содержание ГП IIb-IIIa и ГП Ib и их генетический полиморфизм. Уровень экспрессии ГП IIb-IIIa и ГП Ib не зависел от их генетических полиморфизмов (ГП IIIa Leu33Pro, ГП Ib Thr145Met и ГП Ib (-5)T/C (Kozak)), которые определяли у больных с ОКС (табл. 5).

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБЪЕМА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

Таблица 5. Содержание GPIIb-IIIa and GPIIb и их генетический полиморфизм у больных с ОКС.

	ГPIIa Leu33Leu (n = 79)	ГPIIa Leu33Pro + Pro33Pro (n = 35 + 2)
ГPIIb-IIIa, 10 ³ на 1 тромбоцит	49,1 ± 7,1	48,2 ± 7,9
	ГPIIb Thr145Thr (n = 95)	ГPIIb Thr145Met + Met145Met (n = 19 + 2)
ГPIIb, 10 ³ на 1 тромбоцит	27,1 ± 5,3	28,8 ± 5,0
	ГPIIb (-5)T/T (n = 86)	ГPIIb (-5)C/T + (-5)C/C (n = 29 + 1)
ГPIIb, 10 ³ на 1 тромбоцит	27,0 ± 5,3	28,2 ± 5,5

Примечание. Представлены средние ± стандартные отклонения (при анализе использовали индивидуальные средние значения для каждого пациента). n - Количество пациентов с указанными аллелями. Все различия между генетическими изоформами недостоверны (p>0,1).

ОБСУЖДЕНИЕ. В работе исследовали влияние вариаций COT на агрегационную активность тромбоцитов и содержание GPIIb-IIIa и GPIIb. Исследования проводили в группе здоровых добровольцев и в группе больных с ОКС. У больных с ОКС влияние COT на уровень экспрессии GPIIb-IIIa и GPIIb сравнивали с возможными эффектами генетических полиморфизмов этих белков.

При измерении COT и содержания GPIIb-IIIa и GPIIb была выявлена существенная вариабельность этих показателей, как в группе здоровых добровольцев, так и больных с ОКС. Диапазоны вариаций составили приблизительно 1,7-1,8, 2,0 и 2,5 раза для COT, GPIIb-IIIa и GPIIb соответственно. Мы не обнаружили различий COT и содержания GPIIb-IIIa и GPIIb между здоровыми донорами и больными с ОКС. Однако необходимо учитывать, что в проведенном исследовании эти группы отличались как по возрасту, так и по соотношению лиц женского и мужского пола – больные были старше, и среди них было больше мужчин, чем в группе добровольцев. Возможно, что подобное несоответствие не позволило нам зарегистрировать повышение COT у больных с ОКС, отмеченное в некоторых других работах (см. обзор [1]). Мы также не обнаружили изменений COT и содержания GPIIb-IIIa и GPIIb при повторных измерениях этих показателей у больных в 1, 3-5 и 8-12 сутки после развития ОКС. Учитывая, что время жизни тромбоцитов составляет в среднем 10-14 суток, очевидно, что на 8-12 сутки популяция тромбоцитов была представлено в основном новыми тромбоцитами по сравнению, по крайней мере, с первыми сутками. Таким образом, эти данные свидетельствуют о достаточно высокой индивидуальной стабильности измеряемых показателей. Похожие результаты были получены нами ранее для GPIIb-IIIa при повторных измерениях уровня экспрессии этого белка у здоровых доноров, продемонстрировавших его стабильность в течение 2-6 месяцев [35].

Нами были впервые выявлены прямые корреляционные взаимосвязи между COT и уровнем агрегации тромбоцитов. В группе здоровых добровольцев умеренные, но достоверные корреляции были зарегистрированы

при дозах ADP 1,25 и 2,5 мкМ, а при более высоких дозировках (5 и 20 мкМ) эти тенденции не достигали достоверного уровня. У больных с ОКС достоверные корреляции были получены для обеих использованных дозировок ADP – 5 и 20 мкМ. Важно отметить, что у больных корреляционные взаимосвязи наблюдались только в 1 сутки и только в подгруппе пациентов, получивших АСК, но еще не начавших прием клопидогрела. На фоне сочетанного применения обоих антиагрегантов – АСК и клопидогрела (в 3-5 и 8-12 сутки) подобных корреляций не наблюдалось. По-видимому, это объясняется тем, что у больных с ОКС именно прием клопидогрела – антагониста P2Y₁₂ рецептора ADP, служит главным фактором, влияющим на уровень ADP-индуцированной агрегации. Клопидогрел является пролекарством и инактивация P2Y₁₂ рецептора происходит лишь при действии активного метаболита этого препарата. В связи с этим эффекты клопидогрела существенно зависят от особенностей его сложных метаболических превращений, в которые вовлечены эстеразы и несколько изоформ цитохрома P450, и отличаются высокой вариабельностью (см. обзор [36]). Таким образом, можно предположить, что при получении больными клопидогрела вариации ADP-индуцированной агрегации определяются главным образом индивидуальными характеристиками действия этого препарата, а не какими либо другими параметрами, и в том числе, вариациями COT. Сходные результаты мы получили ранее при оценке влияния на агрегацию тромбоцитов содержания ГП IIb-IIIa – у больных с ОКС мы обнаружили прямые корреляции между уровнем экспрессии этого белка и ADP-индуцированной агрегацией только на фоне применения АСК без клопидогрела, а при насыщении больных клопидогрелом такие корреляции не регистрировались [37].

В настоящей работе была обнаружена высоко достоверная и сильная взаимосвязь между COT и содержанием ГП IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов. Эти корреляции были выявлены как у здоровых добровольцев, так и больных с ОКС. В тоже время мы не отметили какого-либо влияния на уровень экспрессии ГП IIb-IIIa его главного генетического полиморфизма – ГП IIIa Leu33Pro, определяемого у больных с ОКС. Данные о влиянии COT на содержание ГП IIb-IIIa соответствуют результатам, недавно опубликованной работы [16], выполненной в сходных группах доноров и пациентов. Отсутствие каких-либо эффектов ГП IIIa Leu33Pro полиморфизма на уровень экспрессии ГП IIb-IIIa подтверждают как наши собственные данные, полученные ранее при исследовании здоровых добровольцев [14], так и данные других авторов [12, 13, 29, 30]. В обеих исследованных нами группах – здоровых добровольцев и больных с ОКС была впервые обнаружена сильная взаимосвязь между COT и содержанием еще одного адгезивного рецептора тромбоцитов – ГП Ib. Как и в случае ГП IIb-IIIa, мы не зарегистрировали изменений экспрессии ГП Ib в зависимости от генетических полиморфизмов, которые идентифицировали у больных с ОКС. Ранее было продемонстрировано [17] влияние (-5)T/C (*Kozak*) полиморфизма на уровень экспрессии ГП Ib в модельных клетках и небольшой группе здоровых доноров. Однако, эти результаты не были подтверждены в других работах, в которые было включено большее количество доноров [12, 18, 19]. В соответствии с этими данными мы также не обнаружили каких-либо взаимосвязей между (-5)T/C (*Kozak*) полиморфизмом и содержанием ГП Ib. Содержание ГП Ib не различалось и у носителей Thr145Met аллельных вариантов этого белка, что также соответствует ранее опубликованным данным [18, 19]. Таким образом,

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБЪЕМА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

результаты настоящей работы и работ других авторов позволяют утверждать, что уровень экспрессии GPIIb/IIIa и GPIb определяется главным образом вариациями размеров тромбоцитов (т.е. СОТ), а не генетическими полиморфизмами этих гликопротеинов. Мы также зарегистрировали прямые корреляции между содержанием GPIIb/IIIa и GPIb, что явилось ожидаемым результатом, принимая во внимание сильную зависимость экспрессии обоих гликопротеинов от размера тромбоцитов. Важно отметить, что для других адгезивных белков тромбоцитов, в частности для коллагеновых рецепторов – $\alpha 1/\beta 2$ -интегрина и GPI VI, в ряде исследований было отмечено существенное влияние генетических вариантов на уровень их экспрессии – [12, 16, 23] и [20, 31] соответственно. Также необходимо отметить, что кроме размера тромбоцитов и генетической составляющей, на содержание мембранных молекул адгезии могут оказывать влияние и другие факторы, например, такие как отщепления с поверхности протеолитическими ферментами (“шеддинг”) и перераспределение между плазматической мембраной и внутренними мембранными структурами (гранулы и канальцевая система) при активации тромбоцитов.

В настоящем исследовании мы выявили сильную взаимосвязь между СОТ и содержанием GPIIb/IIIa. С другой стороны, ранее мы продемонстрировали прямую корреляцию между содержанием GPIIb/IIIa и агрегацией тромбоцитов, как у здоровых доноров [14, 15, 35], так и у больных с ОКС [15, 37]. В связи с этим можно предположить, что повышенное количество GPIIb/IIIa является одной из причин повышения агрегационной активности тромбоцитов у доноров и больных с высоким СОТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В группе здоровых добровольцев и группе больных с ОКС были выявлены прямые корреляции между: (1) СОТ и уровнем агрегации тромбоцитов, и (2) СОТ и содержанием главных адгезивных рецепторов тромбоцитов - GPIIb/IIIa и GPIb. Наличие подобных взаимосвязей является одним из патофизиологических объяснений высокой тромботической активности крупных тромбоцитов и повышенного риска тромботических событий у больных с высокими значениями СОТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №12-04-00578) и Министерства здравоохранения Российской Федерации (шифр темы 184, РК № 01201351476).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Chu S.G., Becker R.C., Berger P.B., Bhatt D.L., Eikelboom J.W., Konkie B., Mohler E.R., Reilly M.P., Berger J.S.* (2010) *J.Thromb. Haemost.*, **8**, 148-156.
2. *Klovaite J., Benn M., Yazdanyar S., Nordestgaard B.G.* (2011) *J. Thromb. Haemost.*, **9**, 49-56.
3. *Goncalves S.C., Labinaz M., Le May M., Glover C., Froeschl M., Marquis J.F., O'Brien E., Shukla D., Ruchin P., Sookur D., Ha A., Sop D.* (2011) *Am. J. Cardiol.*, **107**, 204-209.
4. *Thompson C.B., Jakubowsky J.A., Quinn P.G., Deykin D., Valeri C.R.* (1983) *J. Lab. Clin. Med.*, **101**, 205-213.
5. *Martin J.F., Trowbridge E.A., Salmon G., Plumb J.* (1983) *Thromb. Res.*, **32**, 443-460.
6. *Wong T., Pedvis L., Frojmovic M.* (1989) *Thromb. Haemost.*, **62**, 733-741.

7. *Varga-Szabo D., Pleines I., Nieswandt B.* (2008) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 403-412.
8. *Ikeda Y., Matsubara Y., Kamata T.* (2008) In: *Platelets in hematologic and cardiovascular disorders.* (Gesele P., Fuster V., Lopez J.A., Page C.P., Vermylen J., eds.). Cambridge: Cambridge University Press. pp. 21-36.
9. *Evangelista V., Smyth S.S.* (2013) In: *Platelets.* Third edition. (Michelson A.D., ed.). Amsterdam, Boston, Heidelberg et al: Academic Press, Elsevier Inc. pp. 295-312.
10. *McEver R.P., Baenziger N.L., Majerus P.W.* (1980) *J. Clin. Invest.*, **66**, 1311-1318.
11. *Wagner C.L., Mascelli M.A., Neblock D.S., Weisman H.F., Collier B.S., Jordan R.E.* (1996) *Blood*, **88**, 907-914.
12. *Huang T., Sahud M.A.* (2003) *Thromb. Res.*, **112**, 147-150.
13. *O'Halloran A.M., Curtin R., O'Connar F., Dooley M., Fitzgerald A., O'Brian J.K., Fitzgerald D.I., Shields D.C.* (2006) *Br. J. Haematol.*, **132**, 494-502.
14. *Sirotkina O.V., Khaspekova S.G., Zabolina A.M., Shimanova Y.V., Mazurov A.V.* (2007) *Platelets*, **18**, 506-514.
15. *Yakushkin V.V., Zyuryaev I.T., Khaspekova S.G., Sirotkina O.V., Ruda M.Ya., Mazurov A.V.* (2011) *Platelets*, **22**, 243-251.
16. *Kunucki T.J., Williams S.A., Nugent D.J., Yeager M.* (2012) *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 147-152.
17. *Afshar-Kharghan V., Li C.Q., Khoshnevis-Asi M., Lopez J.A.* (1999) *Blood*, **94**, 186-191.
18. *Jilma-Stohlawetz P., Homoncik M., Jilma B., Knechtelsdorfer M., Unger P., Mannhalter C., Santoso S., Panzer S.* (2003) *Br. J. Haematol.*, **120**, 652-655.
19. *Corral J., Lozano M.L., Gonzalez-Conejero R., Martinez C., Iniesta J.A., Rivera J., Vicente V.* (2000) *Thromb. Haemost.*, **83**, 23-28.
20. *Joutsu-Korhonen L., Smethurst P.A., Rankin A., Gray E., Jsseldijk M., Onley C.M., Watkins N.A., Williamson L.M., Goodall A.H., de Groot P.G., Farndale R.W., Ouwehand W.H.* (2003) *Blood*, **101**, 4372-4379.
21. *Furihata K., Clemetson K.J., Deguchi H., Kunicki T.J.* (2001) *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1857-1863.
22. *Roest M., Sixma J.J., Wu Y.P., Ijsseldijk M.J., Tempelman M., Slootweg P.J., de Groot P.G., van Zanten G.H.* (2000) *Blood*, **96**, 1433-1437.
23. *Kunicki T.J., Kritzik M., Annis D.S., Nugent D.J.* (1997) *Blood*, **89**, 1939-1943.
24. *Kunicki T.J., Orzechowski R., Honda Y.* (1993) *Blood*, **82**, 2693-2703.
25. *Johnston G.I., Heptinstall S., Robins R.A., Price M.R.* (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 1091-1098.
26. *Jennings L.K., Ashmun R.A., Wang W.C., Dockter M.E.* (1986) *Blood*, **68**, 173-179.
27. *Michelson A.D.* (1987) *J. Lab. Clin. Med.*, **110**, 346-354.
28. *Leytin V., Shapiro H., Novikov I., Radney J.* (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 94-100.
29. *Goodall A.H., Curzen N., Panesar M., Hurd C., Knight C.J., Ouwehand W.H., Fox K.M.* (1999) *Eur. Heart J.*, **20**, 742-747.
30. *Michelson A.D., Furman M.I., Goldschmidt-Clermont P., Mascelli M.A., Hendrix C., Coleman L., Hamlington J., Barnard M.C., Kickler T., Christie D.J., Kundu S., Bray P.F.* (2000) *Circulation*, **101**, 1013-1018.
31. *Best D., Senis Y.A., Jarvis G.E., Eagleton H.J., Roberts D.J., Saito T., Jung S.M., Moroi M., Harrison P., Green F.R., Watson S.P.* (2003) *Blood*, **102**, 2811-2818.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ОБЪЕМА И АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

32. Мазуров А.В., Певзнер Д.В., Власик Т.Н., Руда М.Я. (2004) Росс. Физиол. журнал, **90**, 586-599.
33. Mazurov A.V., Vinogradov D.V., Vlasik T.N., Repin V.S., Booth W.J., Berndt M.C. (1991) Thromb. Res., **62**, 673-684.
34. Douglas H., Michaelides K., Gorog D.A., Durante-Mangoni E., Ahmed N., Davies G.J., Tuddenham E.G.D. (2002) Heart, **87**, 70-74.
35. Хаспекова С.Г., Сироткина О.В., Шиманова Ю.В., Мазуров А.В. (2008) Биомед. химия, **54**, 361-371.
36. Zurn C.S., Geisler T., Gawaz M. (2010) Thromb. Haemost., **103**, 496-506.
37. Хаспекова С.Г., Зюряев И.Т., Якушкин В.В., Голубева Н.В., Руда М.Я., Мазуров А.В. (2011) Кардиология, **51**(7), 4-7.

Поступила: 05. 09. 2013.

**MEAN PLATELET VOLUME: INTERACTIONS WITH PLATELET AGGREGATION
ACTIVITY AND GLYCOPROTEIN IIb-IIIa AND Ib EXPRESSION LEVELS**

*S.G. Khaspekova¹, I.T. Zyuryaev¹, V.V. Yakushkin¹, Ya.A. Naimushin¹, O.V. Sirotkina^{2,3},
N.O. Zaytseva³, M.Ya. Ruda¹, A.V. Mazurov¹*

¹Russian Cardiology Research and Production Complex, 3-ya Cherepkovskaya ul., 15a, Moscow, 121552 Russian Federation; tel.: +7 (495) 4146735, +7(916) 6270543; e-mail: avmazurov@list.ru

²Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Leningrad Region, Russian Federation

³North-Western State Medical University, Saint-Petersburg, Russian Federation

Increased mean platelet volume (MPV) is an independent risk factor of thrombotic events in patients with cardiovascular diseases. Interactions of MPV with platelet aggregation activity and contents of glycoprotein (GP) IIb-IIIa (α IIb/ β 3 integrin, fibrinogen receptor) and GP Ib (von Willebrand factor receptor) were investigated in this study. Investigation was performed in a group of healthy volunteers ($n = 38$) and in a group of patients with acute coronary syndrome (ACS). In patients blood was collected at days 1, 3-5 and 8-12 after ACS development. As an antiaggregant therapy all patients received acetylsalicylic acid (ASA, inhibitor of thromboxane A2 synthesis) and most of them – clopidogrel (ADP receptor antagonist) with the exception of part of the patients ($n=44$) at day 1 who had not taken clopidogrel before first blood collection. In volunteers platelet aggregation was stimulated by 1.25, 2.5, 5 and 20 M ADP, and in patients – by 5 and 20 M ADP. GP IIb-IIIa and GP Ib content on platelet surface was measured using ¹²⁵I-labelled monoclonal antibodies. GP IIb-IIIa and GP Ib genetic polymorphisms were determined in ACS patients. In healthy donors significant correlations between MPV and aggregation levels were revealed at 1.25 and 2.5 M ADP (coefficients of correlation (r) - 0.396 and 0.373, $p<0.05$) and at 5 and 20 those interactions did not reach significant level (r - 0.279 and 0.205, $p>0.05$). Correlations between MPV and aggregation levels were observed at day 1 of ACS in a subgroup of patients who received ASA but had not started clopidogrel treatment (r - 0.526, $p<0.01$ and 0.368, $p<0.05$ for 5 and 20 M ADP respectively). Interactions between these parameters were not registered upon combined treatment with ASA and clopidogrel. Strong direct correlations between MPV and GP IIb-IIIa and GP Ib contents were detected in healthy donors and ACS patients (at all time points) – r from 0.439 to 0.647 ($p\leq 0.001$ for all correlations). Genetic polymorphisms of GP IIb-IIIa (GP IIIa Leu33Pro) and GP Ib ((-5)T/C (*Kozak*) and Thr145Met) identified in ACS patients did not affect expression levels of corresponding glycoproteins. The data obtained indicated that increased MPV values correlate with increased platelet aggregation activity and enhanced GP IIb-IIIa and GP Ib expression.

Key words: mean platelet volume, platelet aggregation, glycoprotein IIb-IIIa, glycoprotein Ib, acute coronary syndrome.