

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

ВАРИАЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОПРОТЕИНА ПЬ-ША (α ПЬ/ β 3 ИНТЕГРИНА) У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ. ВЛИЯНИЕ НА АГРЕГАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АСПИРИНА

С.Г. Хаспекова¹, О.В. Сироткина², Ю.В. Шиманова¹, А.В. Мазуров^{1}*

¹Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий, 121552, Москва, 3-я Черепковская 15а; тел./факс: +7 (495) 4146735; эл. почта: calab@cardio.ru.

²Петербургский институт ядерной физики Российской академии наук, Ленинградская область, 188350, Гатчина.

В группе здоровых доноров исследовали влияние на агрегационную активность тромбоцитов содержания рецептора фибриногена, гликопротеина (ГП) ПЬ-ША (α ПЬ/ β 3 интегрин), генетического полиморфизма ГП ША (замена Leu33Pro) и концентрации фибриногена в плазме крови. У 35 обследованных доноров количество ГП ПЬ-ША на поверхности тромбоцитов варьировало от 40 до 71×10^3 на 1 тромбоцит. При повторных измерениях содержания ГП ПЬ-ША коэффициент вариации составил 9,5%, а отклонения от средних значений не превышали 20%. Уровень и скорость агрегации тромбоцитов, индуцированной ADP (1,25 - 20 мкМ), коррелировали с количеством ГП ПЬ-ША (г от 0,315 до 0,591) и были выше в группе доноров с высоким по сравнению с низким содержанием ГП ПЬ-ША (> 60 и $40-50 \times 10^3$ на 1 тромбоцит соответственно). Аспирин, ингибитор синтеза тромбоксана A_2 , частично подавлял ADP-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Уровень остаточной агрегации в присутствии аспирина также коррелировал с количеством ГП ПЬ-ША и был повышен у лиц с высоким содержанием рецептора. Параметры ADP-индуцированной агрегации не различались в группах доноров с генотипом ГП ША Pro33(-) (Leu33Leu33, n = 20) и Pro33(+) (Leu33Pro33, n = 13, и Pro33Pro33, n = 2). Количество ГП ПЬ-ША на поверхности тромбоцитов также не зависело от полиморфизма ГП ША. Не выявлено достоверных корреляций между уровнем и скоростью агрегации тромбоцитов и концентрацией фибриногена в плазме крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что вариации содержания ГП ПЬ-ША влияют на параметры агрегации тромбоцитов в большей степени, чем полиморфизм ГП ША Leu33Pro и вариации концентрации фибриногена. Повышенное содержание ГП ПЬ-ША ассоциировано с увеличением агрегационной активности тромбоцитов и снижением эффективности ингибирования агрегации аспирином.

Ключевые слова: тромбоциты, гликопротеин ПЬ-ША, интегрины, генетический полиморфизм, фибриноген.

ВВЕДЕНИЕ. Воздействие на тромбоциты протромбогенных агонистов (ADP, тромбин, тромбоксан A_2 (ТХА₂) и др.) стимулирует активацию гликопротеина (ГП) ПЬ-ША (α ПЬ/ β 3-интегрин) и приобретение им способности к связыванию фибриногена. Взаимодействие фибриногена с активированным рецептором

* - адресат для переписки

приводит к образованию молекулярных связей между тромбоцитами и их агрегации [1]. Несмотря на то, что связывание фибриногена с ГП ПЬ-IIIa является ключевой реакцией в процессе агрегации, степень влияния на агрегационную активность тромбоцитов таких факторов, как уровень экспрессии рецептора, его генетический полиморфизм и концентрация фибриногена в плазме крови остается неясной.

Исследования фармакодинамики антагонистов ГП ПЬ-IIIa (мощных ингибиторов агрегации тромбоцитов) показали, что уровень остаточной агрегации при их применении зависит от количества свободных, т.е. не заблокированных препаратом, рецепторов [2, 3]. В то же время по-прежнему остается не выясненным каким образом индивидуальные вариации в содержании ГП ПЬ-IIIa, как у здоровых лиц, так и у пациентов с сердечно-сосудистыми и другими патологиями, могут влиять на показатели агрегации тромбоцитов.

Один из часто встречающихся полиморфизмов ГП ПЬ-IIIa обусловлен заменой T1565C в гене ГП IIIa, которая приводит к замене Leu33Pro в аминокислотной последовательности белка [4]. Количество носителей ГП IIIa Pro аллеля составляет 15-20% в различных Европейских популяциях [5, 6], включая Россию [7]. Медико-генетические исследования показали, что у этих лиц повышен риск развития артериальных тромбозов [7-10], и в связи с этим возникло предположение о возможном влиянии этой мутации на функциональную активность ГП ПЬ-IIIa. Известно, что замена Leu33Pro изменяет антигенную структуру ГП IIIa и определяет наличие на поверхности тромбоцитов P1A1 и P1A2 аллоантигенов соответственно. Различие этих антигенов часто является причиной выработки аллоантител гомозиготными носителями ГП IIIa Pro33 аллеля при неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении и посттрансфузионной пурпуре [5]. Несмотря на структурные отличия ГП IIIa Leu33 и Pro33 аллельных вариантов ГП ПЬ-IIIa, результаты сравнительных исследований их функциональной активности остаются противоречивыми. Vijayan и соавт. [11] показали, что экспрессированная в модельных клетках изоформа рецептора, содержащая ГП IIIa Pro33Pro33, связывается с иммобилизованным фибриногеном и передает активирующий сигнал внутрь клетки эффективнее, чем изоформа, содержащая ГП IIIa Leu33Leu33. В некоторых работах было продемонстрировано повышение активности ГП ПЬ-IIIa и уровня активации и агрегации тромбоцитов у носителей ГП IIIa Pro33 аллеля [6, 12-14]. Однако эти результаты не нашли подтверждения в других исследованиях [15-18].

Концентрация фибриногена - главного лиганда ГП ПЬ-IIIa - это еще один фактор, который может влиять на агрегацию тромбоцитов. Эпидемиологические исследования показали, что увеличение содержания фибриногена ассоциировано с повышением агрегационной активности тромбоцитов [19, 20]. В то же время остается неясным является ли это фактор более важным, чем характеристики рецептора фибриногена, ГП ПЬ-IIIa, такие как вариабельность экспрессии и генетический полиморфизм.

В настоящей работе в группе здоровых доноров проводили исследование взаимосвязи показателей агрегации тромбоцитов с содержанием ГП ПЬ-IIIa на поверхности тромбоцитов, полиморфизмом ГП IIIa Leu33Pro и концентрацией фибриногена в плазме крови. Было также оценено влияние характеристик ГП ПЬ-IIIa на эффективность подавления агрегации аспирином – наиболее распространенным антитромбоцитарным препаратом.

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие реактивы: ADP, ацетилсалициловая кислота (аспирин) ("Sigma-Aldrich", США), йодоген ("Pierce", США), Na[¹²⁵I] ("Медрадиофармпрепарат", Россия), эндонуклеаза MspI ("Fermentas", Литва), олигонуклеотиды ("Синтол", Россия), моноклональное антитело CRC64 против ГП ПЬ-IIIa [21].

Кровь для генотипирования собирали в 5% ЭДТА в соотношении кровь: антикоагулянт – 9:1, ДНК выделяли фенол-хлороформным методом, а наличие мутации ГП IIIa Leu33Pro определяли по методу, описанному

Newman и соавт. [4], с помощью ПЦР и последующего рестрикционного анализа с использованием эндонуклеазы MspI. Типирование по аллелям ГП IIIa Leu33 и Pro33 проводили у 78 добровольцев, а также у отца и матери ребёнка с неонатальной аллоиммунной тромбоцитопенией.

Кровь для исследования агрегации тромбоцитов, связывания ^{125}I -меченного антитела CRC64 (^{125}I -CRC64) и определения фибриногена собирали в 3,8% цитрат натрия в соотношении кровь:антикоагулянт – 9:1. Все доноры не принимали лекарств в течение 2 недель перед забором крови. Повторные заборы крови проводили с интервалом не менее 2 месяцев. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали, центрифугируя кровь 10 мин при 150 g, при комнатной температуре. После отбора ОТП, оставшуюся кровь центрифугировали 20 мин при 1000 g при комнатной температуре для получения плазмы без тромбоцитов, которую использовали для разведения ОТП и определения фибриногена. Концентрацию тромбоцитов в ОТП определяли в счетчике тромбоцитов PL100 (Sysmex, Япония) и разводили ОТП не содержащей тромбоцитов плазмой до концентрации тромбоцитов $2,5 \times 10^8$ в 1 мл.

Агрегацию тромбоцитов регистрировали в анализаторе агрегации БИОЛА (БИОЛА, Россия) при 37°C и перемешивании со скоростью 800 об/мин, измеряя изменения светопропускания (Т, %) в ОТП. ADP добавляли к ОТП через 30 сек после начала регистрации и проводили измерения в течение 4,5 мин после добавления индуктора. Аспирин в конечной концентрации 1 мМ добавляли к ОТП не менее, чем за 5 мин до добавления ADP. При анализе агрегационных кривых определяли максимальные уровень (Т % макс.) и скорость агрегации (V макс., Т % в 1 мин). Агрегацию считали необратимой, если светопропускание увеличивалось в течение всего времени регистрации, и обратимой, если после первой волны агрегации, наблюдалось снижение светопропускания.

Антитело CRC64 метили ^{125}I и измеряли его связывание с тромбоцитами, как описано ранее [22]. ^{125}I -CRC64 в насыщающей концентрации 10 мкг/мл инкубировали с ОТП 30 мин при 37°C в отсутствие (общее связывание) или присутствии 50-кратного избытка немеченного антитела (неспецифическое связывание). Связанную с тромбоцитами и свободную метку разделяли центрифугированием ОТП через раствор 20% сахарозы. Специфическое связывание рассчитывали, как общее – неспецифическое. Количество молекул связавшегося антитела на 1 тромбоцит считали равным количеству молекул ГП IIb-IIIa.

Фибриноген определяли по методу Клаусса в анализаторе STA-Compact (Diagnostica Stago, США).

Статистический анализ проводили с помощью программы “Statistica 6 for Windows”. В тех случаях, когда какой-либо показатель повторно определяли у одного донора, для анализа использовали средние величины. Распределения большинства переменных были не нормальные (критерий Шапиро-Вилкса), и поэтому, для их анализа применяли непараметрические методы. Различия между независимыми и зависимыми переменными определяли с помощью критериев Манна-Уитни и Вилкоксона соответственно. Корреляции оценивали, используя критерий Спирмана. Различия и корреляции считали достоверными при $p < 0,05$. Данные представляли в виде средних \pm стандартные ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Полиморфизм ГП IIIa Leu33Pro определяли у 78 случайно выбранных добровольцев. Генотип Leu33Leu33 имели 52 человека, Leu33Pro33 – 15 и Pro33Pro33 – 1. Соответственно частота аллелей была 0,89 (Leu33) и 0,11 (Pro33), что является типичным для Европейских популяций [5-7]. В дальнейшем в исследование было включено 34 человека из этой группы – 20 с генотипом Leu33Leu33, 13 – Leu33Pro33 и 1 – Pro33Pro33, а также мать ребенка с неонатальной тромбоцитопенией, имеющая генотип Pro33Pro33. Группы доноров с генотипами ГП IIIa Pro33(-) (Leu33Leu33) и Pro33(+) (Leu33Pro33 + Pro33Pro33) не отличались по возрасту и соотношению мужчин и женщин (табл. 1). Никто из доноров не имел клинических признаков сердечно-сосудистых, гематологических и других патологий.

ГЛИКОПРОТЕИНЫ ПЬ-IIIa И АГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

Таблица 1. Характеристика доноров с различным генотипом ГП IIIa.

| Параметр | Генотип ГП IIIa | |
|------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|
| | Pro33(-) (Leu33Leu33) | Pro33(+) (Pro33Leu33 + Pro33Pro33) ¹ |
| | Общая группа (мужчины + женщины) | |
| n | 20 | 15 |
| Возраст | 42 ± 2 | 39 ± 3 |
| Мужчины/женщины, n (% мужчин) | 8/12 (40%) | 6/9 (40%) |
| Мужчины | | |
| Возраст | 45 ± 4 | 36 ± 6 |
| Женщины | | |
| Возраст | 40 ± 3 | 42 ± 4 |

Примечание: 1 - Тринадцать доноров с генотипом Pro33Leu33 и два донора (женщины) с генотипом Pro33Pro33. Все различия между группами не достоверны.

Количество ГП ПЬ-IIIa на поверхности тромбоцитов определяли по связыванию ¹²⁵I-меченного антитела CRC64 против комплекс-специфичного эпитопа в молекуле рецептора [21]. У 35 доноров содержание ГП ПЬ-IIIa варьировало (40,0-71,3)×10³ на 1 тромбоцит, а средний уровень составил (52,9±1,6)×10³. У 26 доноров в течение 1 года проводили повторные определения ГП ПЬ-IIIa с интервалом между заборами крови от 2 до 7 месяцев. У 17 доноров было проведено 2, у 6 - 3 и у 3 - 4 определения. При повторных анализах у одного и того же донора не наблюдалось существенных различий в количестве ГП ПЬ-IIIa - максимальные отклонения от средних значений не превысили 20% (см. также рис. 1а), а коэффициент вариации, рассчитанный с учетом всех повторных анализов (n = 64), составил 9,5%. Содержание ГП ПЬ-IIIa было несколько выше у носителей ГП IIIa Pro33 (~ на 10%) (рис. 1б), однако эти различия не достигали достоверного уровня (p = 0,062).

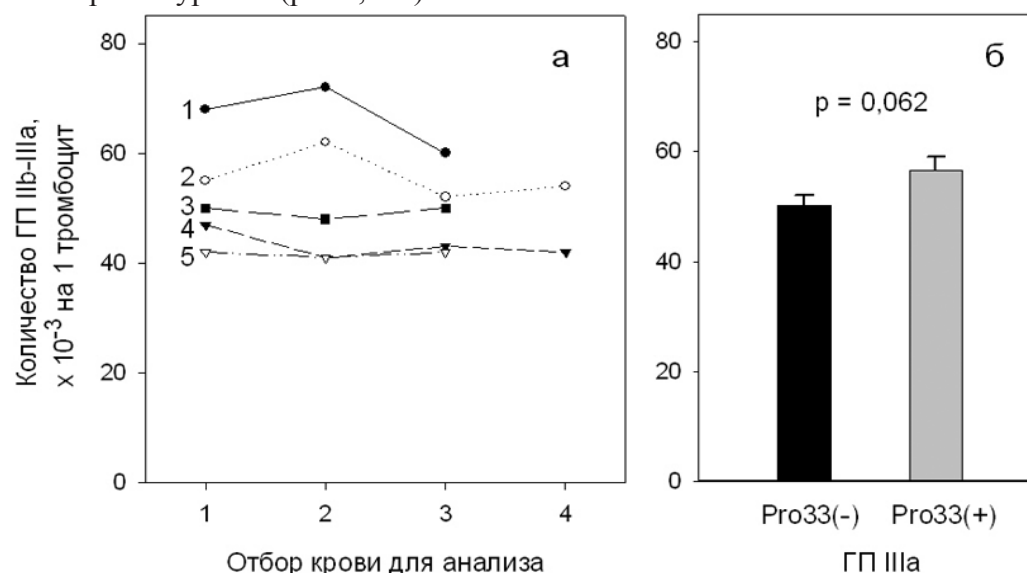


Рисунок 1.

Количество ГП ПЬ-IIIa на поверхности тромбоцитов здоровых доноров. (а) Количество ГП ПЬ-IIIa у доноров 1 (●), 2 (○), 3 (■), 4 (▼) и 5 (▽) при повторных измерениях. Отбор крови для анализов проводили с интервалом 2-4 месяца. (б) Количество ГП ПЬ-IIIa у доноров с генотипом ГП IIIa Pro33(-) (n = 20) и Pro33(+) (n = 15). Здесь и на рисунках 2 и 4 представлены средние ± ошибки средних, p – достоверность различий между группами.

Максимальные уровень и скорость агрегации тромбоцитов, индуцированные различными концентрациями ADP (от 1,25 до 20 мкМ), коррелировали с количеством ГП IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов (табл. 2). Наиболее высокие (r от 0,492 до 0,591) и достоверные ($p \leq 0,003$) взаимосвязи между этими показателями были зарегистрированы при стимуляции агрегации 2,5 и 5,0 мкМ ADP. Менее выраженные (r от 0,315 до 0,388), но достоверные или близкие к достоверным корреляции наблюдались и при других концентрациях индуктора - максимальной (20 мкМ) и минимальной (1,25 мкМ). Мы сравнили показатели агрегации у доноров с содержанием ГП IIb-IIIa $> 60 \times 10^3$ ($(67,4 \pm 1,7) \times 10^3$, $n = 7$) и $(40-50) \times 10^3$ на 1 тромбоцит ($(44,3 \pm 0,7) \times 10^3$, $n = 15$). У доноров с высоким содержанием ГП IIb-IIIa уровень и скорость агрегации были существенно, при некоторых дозах ADP более, чем в 2 раза, выше, чем у доноров с низким содержанием рецептора (рис. 2а и 2б). У всех 7 доноров с высоким содержанием ГП IIb-IIIa ADP в концентрациях 2,5 и 5 мкМ стимулировал необратимую агрегацию тромбоцитов. В то же время в группе с низким содержанием рецептора у 10 из 15 доноров ADP в концентрации 2,5 мкМ вызывал лишь обратимую агрегацию, а у 5 доноров агрегация была обратимой даже при добавлении 5 мкМ ADP.

Таблица 2. Корреляции параметров ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов и количества ГП IIb-IIIa.

| | Корреляция максимального уровня агрегации (Т % макс.) и количества ГП IIb-IIIa | | Корреляция максимальной скорости агрегации (V макс, Т % в 1 мин) и количества ГП IIb-IIIa | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| | г | р | г | р |
| 20 мкМ ADP | 0,315 | 0,065 | 0,388 | 0,021 |
| 5 мкМ ADP | 0,514 | 0,002 | 0,591 | < 0,001 |
| 2,5 мкМ ADP | 0,492 | 0,003 | 0,564 | < 0,001 |
| 1,25 мкМ ADP | 0,367 | 0,030 | 0,381 | 0,024 |

Примечание: г – Коэффициент корреляции, р – достоверность корреляции ($n = 35$).

Мы не выявили различий при сравнении параметров агрегации у доноров с генотипом ГП IIIa Pro33(-) и Pro33(+) (рис. 2в и 2г). Наблюдалась тенденция к несколько более высоким показателям у лиц с генотипом Pro33(+), но различия во всех случаях были недостоверны ($p = 0,060$ для скорости агрегации при 5 мкМ ADP, для остальных показателей – $p > 0,1$).

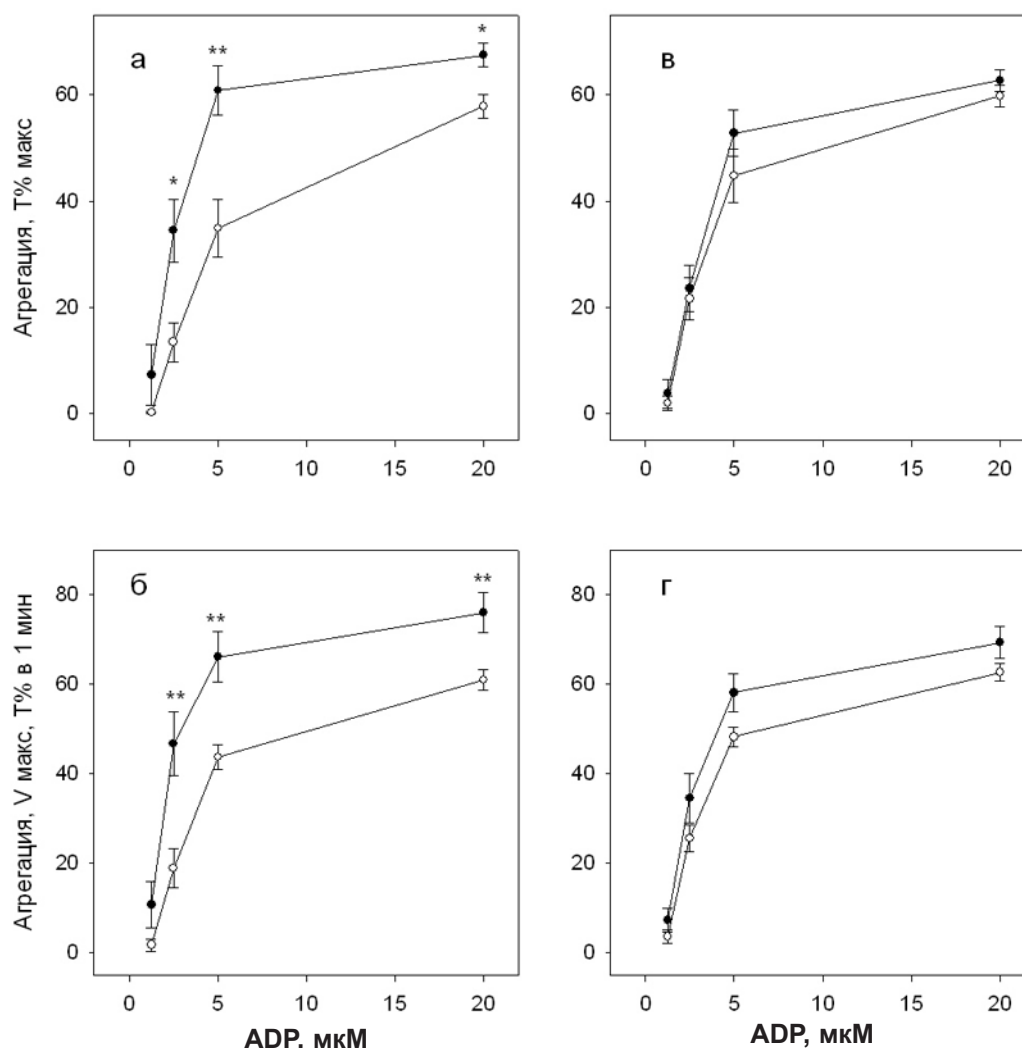


Рисунок 2.

Параметры ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов у доноров с различным содержанием ГП ПЬ-IIIa на поверхности тромбоцитов и различным генотипом ГП IIIa. Приведены максимальные уровни (а, в) и максимальные скорости (б, г) агрегации. (а, б) – Параметры агрегации у доноров с высоким ($n = 7$) (●) и низким ($n = 15$) (○) содержанием ГП ПЬ-IIIa (> 60 и $(40-50) \times 10^3$ на 1 тромбоцит соответственно). (в, г) – Параметры агрегации у доноров с генотипом ГП IIIa Pro33(+) ($n = 15$) (●) и Pro33(-) ($n = 20$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – достоверности отличий между донорами с высоким и низким содержанием ГП ПЬ-IIIa. Все различия между донорами с различным генотипом ГП IIIa не достоверны.

Концентрация фибриногена в плазме у обследованных доноров варьировала от 2,22 до 5,02 мг/мл ($3,40 \pm 0,12$ мг/мл). При анализе взаимосвязи параметров ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов с концентрацией фибриногена достоверных корреляций выявлено не было. Близкие к достоверным значения были получены только для уровня агрегации при 5 мкМ ADP ($r = 0,324$, $p = 0,061$). Для остальных показателей – $r < 0,3$ и $p \geq 0,1$.

Влияние характеристик ГП ПЬ-IIIa на антиагрегационное действие аспирина, ингибитора синтеза TXA_2 [23], исследовали у 27 доноров, стимулируя агрегацию 5 мкМ ADP (рис. 3). В этих условиях аспирин подавлял агрегацию тромбоцитов, блокируя развитие так называемой второй волны, зависящей от синтеза TXA_2 .

Аспирин снижал уровень агрегации в среднем на $51 \pm 5\%$ ($p < 0,001$). Скорость агрегации снижалась в меньшей степени – на $19 \pm 4\%$ ($p < 0,001$). (За 100% принимали параметры агрегации в образцах без аспирина). Уровень остаточной агрегации обработанных аспирином тромбоцитов коррелировал с количеством ГП IIb-IIIa ($r = 0,542$, $p = 0,003$) и был более чем в 2 раза выше у доноров с высоким содержанием рецептора (рис. 4а). Это повышение было обусловлено различием исходных уровней агрегации, которые в одинаковой степени снижались в группах с высоким и низким содержанием ГП IIb-IIIa – на 47 ± 11 и $53 \pm 8\%$ соответственно. Аспирин также в одинаковой степени снижал уровень агрегации у доноров с генотипом ГП IIIa Pro33(-) и Pro33(+) – на 55 ± 6 и $46 \pm 6\%$ соответственно (рис. 4б). Как в контрольных образцах, так и в присутствии препарата агрегация была несколько повышена у носителей Pro33 аллеля, но эти различия были недостоверны ($p = 0,072$ в присутствии аспирина и $p > 0,1$ без препарата).

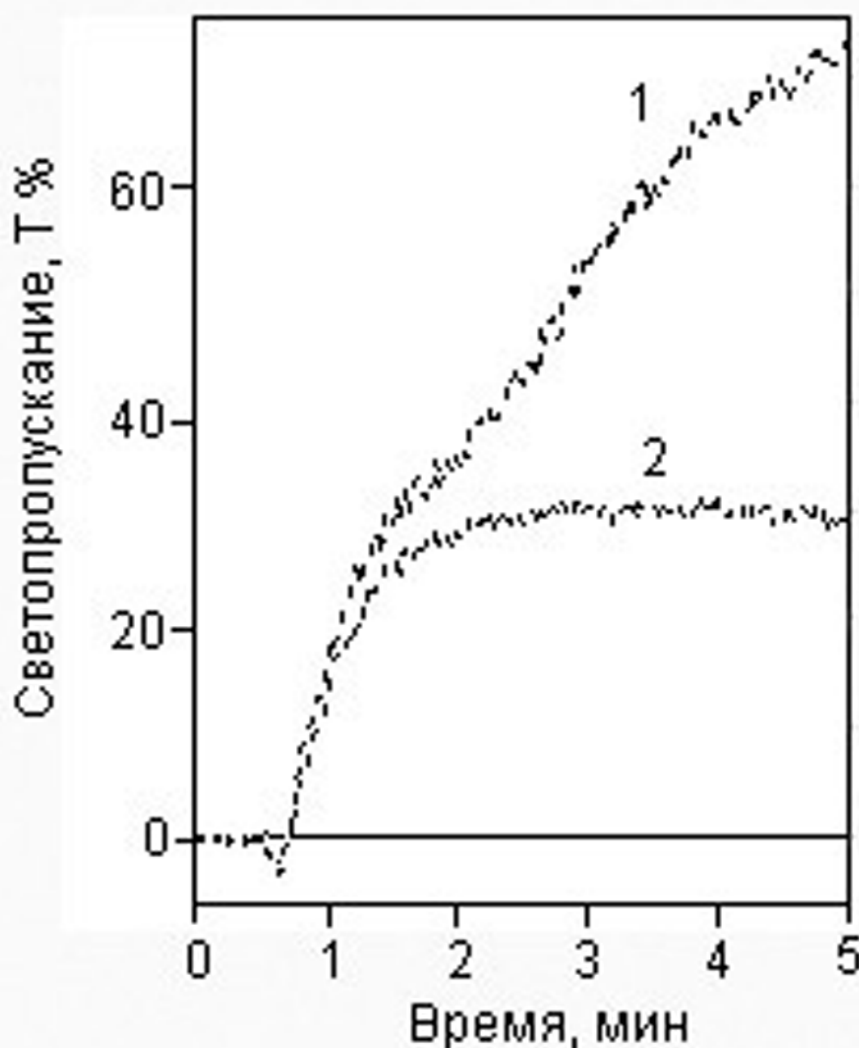


Рисунок 3.

Ингибирование ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов аспирином. Агрегацию индуцировали 5 мкМ ADP без добавления (кривая 1) или в присутствии 1 мМ аспирина (кривая 2). Сравнение кривых указывает на то, что аспирин подавляет развитие второй волны агрегации тромбоцитов.

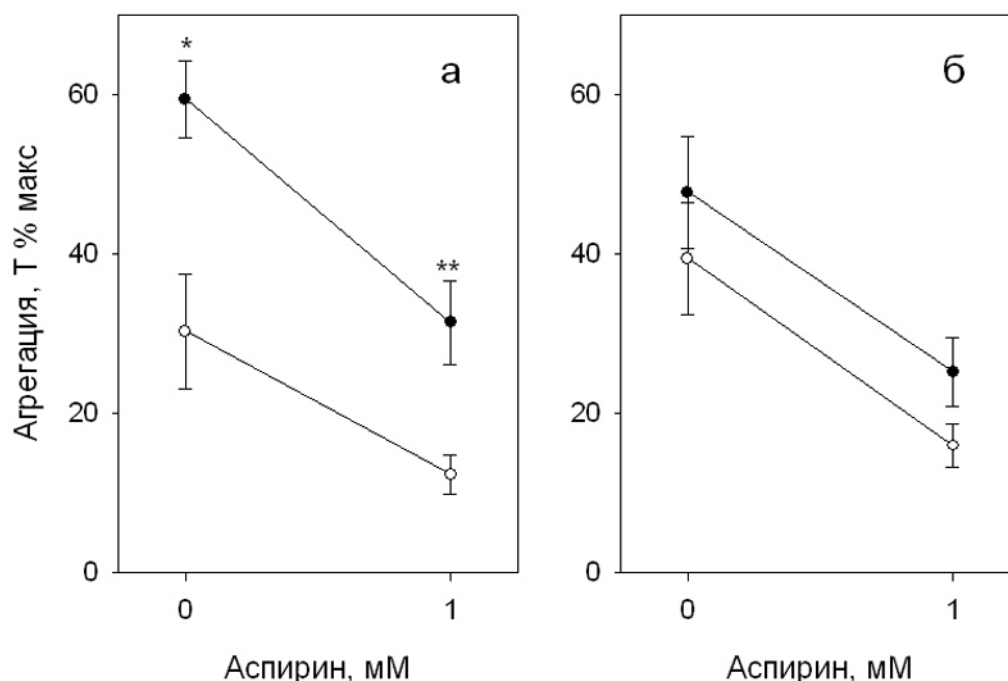


Рисунок 4.

Уровень агрегации тромбоцитов, индуцированной 5 мкМ ADP без добавления и в присутствии 1 мМ аспирина, у доноров с различным содержанием ГП IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов и различным генотипом ГП IIIa. (а) – Уровень агрегации у доноров с высоким ($n = 6$) (●) и низким ($n = 14$) (○) содержанием ГП IIb-IIIa (> 60 и $(40-50) \times 10^3$ на 1 тромбоцит соответственно). (б) – Уровень агрегации у доноров с генотипом ГП IIIa Pro33(+) ($n = 11$) (●) и Pro33(-) (○) ($n = 16$). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – достоверности отличий между донорами с высоким и низким содержанием ГП IIb-IIIa. Различия между донорами с различным генотипом ГП IIIa не достоверны.

ОБСУЖДЕНИЕ. В группе из 35 здоровых добровольцев были зафиксированы почти двукратные вариации содержания ГП IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов – от $(40-71) \times 10^3$ на 1 тромбоцит. Повторные измерения, проводимые в течение 1 года у большинства доноров, показали, что содержание ГП IIb-IIIa является достаточно стабильным показателем – коэффициент вариации составил менее 10%. Мы не обнаружили достоверных различий в количестве ГП IIb-IIIa у доноров с генотипом ГП IIIa Pro33(-) и Pro33(+), что соответствует результатам, опубликованным ранее как нами [24], так и другими авторами [12, 13].

Были выявлены положительные корреляции между количеством ГП IIb-IIIa и параметрами агрегации тромбоцитов, индуцированной различными концентрациями ADP. Уровень и скорость агрегации были повышены (при некоторых дозах ADP более чем в 2 раза) у лиц с высоким по сравнению с низким содержанием ГП IIb-IIIa (> 60 и $(40-50) \times 10^3$ молекул на 1 тромбоцит соответственно). Различия агрегационных кривых в этих группах имели не только количественный, но и качественный характер. У всех доноров с высоким содержанием ГП IIb-IIIa 2,5 и 5,0 мкМ ADP стимулировали развитие необратимой агрегации, в то время как у многих доноров с низким содержанием рецептора при действии тех же доз ADP агрегация была обратимой. Полученные результаты свидетельствуют о том, что вариации количества ГП IIb-IIIa на поверхности тромбоцитов являются одним из важных факторов, определяющих их агрегационную активность. Мы продемонстрировали наличие взаимосвязи между количеством ГП IIb-IIIa и

параметрами агрегации, индуцированной, не только высокими, но и низкими, далекими от насыщающих дозами ADP (2,5 и 1,25 мкМ). Ранее мы показали, что уровень так называемой спонтанной агрегации тромбоцитов, т.е. образование микроагрегатов в ОТП некоторых доноров и пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями без добавления экзогенных агонистов, также коррелирует с количеством ГП IIb-IIIa [24]. Эти данные указывают на то, что общее содержание рецептора влияет на показатели агрегации даже в тех случаях, когда уровень активации тромбоцитов относительно низок и количество активированных молекул ГП IIb-IIIa, связывающих фибриноген и участвующих в образовании агрегатов, также относительно невелико.

Аспирин является необратимым ингибитором циклооксигеназы, фермента, катализирующего превращение арахидоновой кислоты в простагландиновые эндоперекиси, из которых образуется TXA_2 [23]. Воздействие на тромбоциты разных агонистов стимулирует образование TXA_2 , который усиливает активацию тромбоцитов и увеличивает количество активированных молекул ГП IIb-IIIa. При стимуляции агрегации ADP TXA_2 вызывает развитие так называемой второй волны агрегации и делает процесс образования агрегатов необратимым. Мы пытались выяснить, зависит ли эффективность антиагрегационного действия аспирина от вариаций в содержании ГП IIb-IIIa. Аспирин в одинаковой степени (~ на 50%) подавлял агрегацию тромбоцитов в группах с высоким и низким содержанием ГП IIb-IIIa. Однако в связи с тем, что исходный уровень агрегации был выше у лиц с высоким содержанием рецептора, уровень остаточной агрегации в присутствии препарата в этой группе также был существенно (более чем в 2 раза) выше, чем у доноров с низким содержанием ГП IIb-IIIa. Аспирин - один из наиболее распространенных антитромботических препаратов. Его применение уменьшает риск развития инфаркта миокарда, инсульта и других тромботических патологий [23]. Снижение эффективности ингибирования агрегации тромбоцитов аспирином, т.е. развитие резистентности, является хорошо известным феноменом. Резистентность к аспирину регистрируется, по разным данным, с частотой от 5 до 40% у разных групп больных, но причины ее развития остаются неясными [23, 25]. Наши результаты указывают на то, что повышение агрегационной активности тромбоцитов у лиц с высоким содержанием ГП IIb-IIIa может быть одной из причин сохранения высокого уровня агрегации на фоне приема аспирина.

Мы также исследовали влияние на агрегацию тромбоцитов полиморфизма ГП IIb-IIIa, обусловленного заменой Leu33Pro в ГП IIIa, но не обнаружили достоверных различий в уровне и скорости агрегации между донорами с генотипом ГП IIIa Pro33(-) и Pro33(+). При некоторых концентрациях ADP (в том числе в присутствии аспирина) параметры агрегации были несколько выше у носителей Pro33 аллеля, однако эти тенденции не достигали достоверного уровня. Важно отметить, что эти отличия были существенно менее выражены, чем отличия между донорами с высоким и низким содержанием ГП IIb-IIIa (см. рис. 2 и 4). Эти результаты свидетельствуют о том, что вариации количества ГП IIb-IIIa влияют на агрегацию тромбоцитов в гораздо большей степени, чем полиморфизм ГП IIIa. Ограничением генетической части нашего исследования было низкое количество гомозиготных носителей ГП IIIa Pro33 аллеля ($n = 2$), что обусловлено низкой частотой этого генотипа в Российской популяции – 1-2%. Ранее, авторами, которым удалось сформировать отдельные группы доноров с генотипом ГП IIIa Pro33Pro33 и Leu33Pro33, было показано, что способность тромбоцитов к активации и агрегации повышена главным образом у гомозиготных носителей Pro33 аллеля [6, 13, 14]. В то же время в работах, в которых, как и в нашем исследовании, было проанализировано относительно малое количество Pro33 гомозигот, чаще всего также не удавалось выявить взаимосвязей между показателями активации и агрегации тромбоцитов и генотипом ГП IIIa [15-18]. Совокупность этих данных указывает на то, что эффекты мутации ГП IIIa Leu33Pro проявляются, в основном, у гомозиготных носителей Pro33

аллеля. Однако, учитывая низкую частоту этого генотипа (1-2%) мы предполагаем, что в общей популяции полиморфизм ГП IIIa является менее значимой причиной увеличения активности тромбоцитов по сравнению с повышенным содержанием ГП ПЬ-IIIa.

Корреляции между концентрацией фибриногена в плазме крови и интенсивностью агрегации тромбоцитов были ранее продемонстрированы в двух эпидемиологических исследованиях, включавших около 1000 доноров [19, 20]. В настоящей работе нам не удалось зарегистрировать достоверных взаимосвязей между этими показателями, что, по-видимому, обусловлено существенно меньшим количеством обследованных доноров. Однако, даже в этой небольшой группе мы выявили сильные и достоверные корреляции между агрегационной активностью тромбоцитов и количеством ГП ПЬ-IIIa. Эти данные указывают на то, что параметры агрегации в меньшей степени зависят от вариаций концентраций фибриногена, чем от вариаций содержания его рецептора ГП ПЬ-IIIa.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 06-04-48186 и 05-04-49116).

ЛИТЕРАТУРА

1. Quinn M.J., Byzova T.V., Qin J., Topol E.J., Plow E.F. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 945-952.
2. Thcheng J.E., Ellis S.G., George B.S., Kereiakes D.J., Kleiman N.S., Talley J.D., Wang A.L., Weisman H.F., Califf R.M., Topol E.J. (1994) *Circulation*, **90**, 1757-1764.
3. Mazurov A.V., Pevzner D.V., Antonova O.A., Byzova T.V., Khaspekova S.G., Semenov A.V., Vlasik T.N., Samko A.N., Staroverov I.I., Ruda M.Ya. (2002) *Platelets*, **13**, 465-477.
4. Newman P.J., Derbes R.S., Aster R.H. (1989) *J. Clin. Invest.*, **83**, 1778-1781.
5. Kunicki T.J., Newman P.J. (1992) *Blood*, **80**, 1386-1404.
6. Feng D., Lindpaintner K., Larson M.G., Rao V.S., O'Donnell C.J., Lipinska I., Schmitz C., Sutherland P.A., Silbershatz H., D'Agostino R.B., Muller J.E., Myers R.H., Levy D., Tofler G.H. (1999) *Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 1142-1147.
7. Сироткина О.В., Шейдина А.М., Волкова М.В., Беркович О.А., Баженова Е.А., Черкашин Д.В., Бойтцов С.А., Шляхто Е.В., Шварц Е.И. (2004) *Мед. Акад. Ж.*, **4**, 29-35.
8. Weiss E.J., Bray P.F., Tayback M., Schulman S.P., Kickler T.S., Becker L.C., Weiss J.L., Gerstenblith G., Goldschmidt-Clermont P.J. (1996) *N. Engl. J. Med.*, **334**, 1090-1094.
9. Byzova T.V., Plow E.F. (2000) *J. Clin. Invest.*, **105**, 697-698.
10. Di Castelnuovo A., de Gaetano G., Benedetta Donati M., Iacoviello L. (2005) *Am. J. Pharmacogenomics*, **5**, 93-99.
11. Vijayan K.V., Goldschmidt-Clermont P.J., Roos C., Bray P.F. (2000) *J Clin Invest*, **105**, 793-802.
12. 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.
13. 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.
14. Bennett J.S., Catella-Lawson F., Rut A.R., Vilaire G., Qi W., Kapoor S.C., Murphy S., FitzGerald G.A. (2001) *Blood*, **97**, 3093-3099.
15. Lasne D., Krenn M., Pingault V., Arnaud E., Fiessinger J.N., Aiach M., Rendu F. (1997) *Br. J. Haematol.*, **99**, 801-807.
16. Andrioli G., Minuz P., Solero P., Pincelli S., Ortolani R., Lussignoli S., Bellavite P. (2000) *Br. J. Haematol.*, **110**, 911-918.

17. Frey U.H., Aral N., Muller N., Siffert W. (2003) *Thromb. Res.*, **109**, 279-286.
18. Aalto-Setälä K., Karhunen P.J., Mikkelsen J., Niemela K. (2005) *J. Thromb. Thrombolysis*, **20**, 57-63.
19. Feng D., Lindpaintner K., Larson M.G., O'Donnell C.J., Lipinska I., Sutherland P.A., Mittleman M., Muller J.E., D'Agostino R.B., Levy D., Toftler G.H. (2001) *Circulation*, **104**, 140-144.
20. Meade T.W., Vickers M.V., Thompson S.G., Stirling Y., Haines A.P., Miller G.J. (1985) *Br. Med. J.*, **290**, 428-432.
21. Бызова Т.В., Власик Т.Н., Мазуров А.В. (1994) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **118**, 402-405.
22. Khaspekova S.G., Vlasik T.N., Byzova T.V., Vinogradov D.V., Berndt M.C., Mazurov A.V. (1993) *Br. J. Haematol.*, **85**, 332-340.
23. Patrono C., Collier B., Dalen J.E., Fitzgerald G.A., Fuster V., Gent M., Hirsh J., Roth G. (2001) *Chest*, **199** (Suppl), 39S-63S.
24. Сироткина О.В., Заботина А.М., Тараскина А.Е., Сиваченко Е.Б., Зуева Е.Е., Кадинская М.И., Бурячковская Л.И., Учитель И.А., Хаспекова С.Г., Вавилова Т.В., Шварцман А.Л., Мазуров А.В. (2007) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **143**, 398-401.
25. Hankey G.J., Eikelboom J.W. (2004) *Br. Med. J.*, **328**, 477-479.

Поступила: 25. 09. 2007.

VARIATIONS IN GLYCOPROTEIN IIb-IIIa (α IIb/ β 3-INTEGRIN) CONTENT IN HEALTHY DONORS. INFLUENCE ON PLATELET AGGREGATION ACTIVITY AND EFFICACY OF ASPIRIN ACTION

S.G. Khaspekova¹, O.V. Sirotkina², Y.V. Shimanova¹, A.V. Mazurov¹

¹Cardiology Research and Production Complex, Russian Ministry of Health, 3-ya Cherepkovskaya ul., 15a, Moscow, 121552 Russia; fax: +7 (495) 4146735; e-mail: calab@cardio.ru

²Petersburg Nuclear Physics Institute, Russian Academy of Sciences; Leningrad region, Gatchina, 188350 Russia; fax: +7 (81371) 32303; e-mail: olga_sirotkina@mail.ru

Effects of fibrinogen receptor, glycoprotein (GP) IIb-IIIa (α IIb/ β 3-integrin) content, GP IIIa genetic polymorphism (substitution Leu33Pro) and fibrinogen concentration in blood plasma on platelet aggregation activity were studied in a group of healthy volunteers. The GP IIb-IIIa content on platelet surface in 35 tested donors varied $(40-71) \times 10^3$ per platelet. Repeated measurements revealed that the GP IIb-IIIa content coefficient of variation was 9.5%, and deviations from mean levels did not exceed 20%. The level and rate of platelet aggregation induced by ADP ($1.25 - 20$ M) correlated with GP IIb-IIIa number (r from 0.315 to 0.591) and were higher in a group of donors with high in comparison with low GP IIb-IIIa content (> 60 and $(40-50) \times 10^3$ per platelet respectively). Aspirin, the inhibitor of thromboxane A_2 synthesis, partially suppressed ADP-induced platelet aggregation. The level of residual aggregation in the presence of aspirin also correlated with GP IIb-IIIa content and increased in subjects with high receptor content. Parameters of ADP-induced aggregation did not differ in donors with GP IIIa Pro33(-) (Leu33Leu33, $n = 20$) and Pro33(+) (Leu33Pro33, $n = 13$, and Pro33Pro33, $n = 2$) genotype. GP IIb-IIIa content was also not affected by GP IIIa polymorphism. No significant correlations were found between the level and rate of platelet aggregation and fibrinogen concentration in blood plasma. The data obtained indicate that effects of GP IIb-IIIa variations in content on platelet aggregation are higher than GP IIIa Leu33Pro polymorphism and variations of fibrinogen concentration. High GP IIb-IIIa content is associated with increased platelet aggregation activity and decreased efficacy of aggregation inhibition by aspirin.

Key words: platelets, glycoprotein IIb-IIIa, integrins, genetic polymorphism, fibrinogen.