Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 5, с. 606-612.

УДК 577.217.5
©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

О.В. Сироткина[1,2,3]*, А.Б. Ласковец[3], В.В. Голдобин[3], А.А. Топанова[3], Д.В. Карелов[1,4], Т.В. Вавилова[2,3]

[1]НИЦ "Курчатовский институт",
Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова, 188300,
Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова Роща, факс: (813-71)323-03;
эл. почта: olga_sirotkina@mail.ru
[2]Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2
[3]Северо-Западный Государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41
[4]Санкт-Петербургский Государственный политехнический университет,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, д. 29

Цереброваскулярные заболевания занимают второе место среди причин смертности населения и являются одной из наиболее важных медико-социальных проблем. При повреждении стенки сосуда эндотелиальные клетки секретируют содержащийся в них фактор Виллебранда, который связывается со своим рецептором на поверхности тромбоцита – гликопротеином GP Ib-V-IX. Известны полиморфизмы Thr145Met и T(-5)C гена GP Ibα, которые связаны с риском развития артериальных тромбозов, показаны отличия в экспрессионном профиле тромбоцитов пациентов с различным течением ишемической болезни сердца. Целью данного исследования явилось определение роли тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда в активации тромбоцитов у больных с цереброваскулярными заболеваниями. В исследование были включены 123 пациента с цереброваскулярными заболеваниями и 97 здоровых добровольцев, у которых были проанализированы: количество рецептора для фактора Виллебранда методом проточной цитометрии, наличие полиморфизмов Thr145Met и T(-5)C GP Ibα методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом, уровень экспрессии гена GP Ibα методом ПЦР в реальном времени и ADP-индуцированная агрегация по Борну. Нами показано, что: 1) полиморфный аллель 145Met GP Ibα чаще встречается у пациентов, перенесших ишемический инсульт на фоне макроангиопатии сосудов головного мозга; 2) в активированных тромбоцитах пре-мРНК гена GP Ibα преобразуется в зрелую мРНК, и этот процесс блокируется приёмом антиагрегантных препаратов ацетилсалициловой кислоты.

Ключевые слова: рецептор для фактора Виллебранда, ген GP Ibα, полиморфизмы Thr145Met и T(-5)C GP Ibα, пре-мРНК GP Ibα, мРНК GP Ibα

DOI: 10.18097/PBMC20156105606

ВВЕДЕНИЕ

Цереброваскулярные заболевания занимают второе место среди причин смертности населения и являются одной из наиболее важных медико-социальных проблем [1]. Ишемический инсульт является ведущей причиной инвалидизации, обуславливая до 80% частичной и до 10% полной нетрудоспособности [2]. Среди пациентов перенёсших инсульт, 31% требует постоянного ухода, 20% не могут самостоятельно передвигаться [3]. Основная причина острой ишемии при атеротромботическом варианте инсульта – тромботические осложнения атеросклероза, в развитии которых определяющую роль имеет взаимоотношение тромбоцитов и эндотелия сосудистой стенки.

При повреждении стенки сосуда эндотелиальные клетки секретируют содержащийся в них фактор Виллебранда, который связывается со своим рецептором на поверхности тромбоцита – гликопротеином GP Ib-V-IX. Связь рецептора с лигандом приводит к активации тромбоцита –

* - адресат для переписки

его ультраструктурной реорганизации, и, как следствие, к быстрому изменению его формы, увеличению площади поверхности тромбоцита и экскреции содержимого гранул хранения. Комплекс GP Ib-IX-V состоит из четырёх полипептидов GP Ibα, GP Ibβ, GP IX и GP V, которые кодируются четырьмя разными генами. Мутации в гене GP Ibβ ведут к преждевременной терминации трансляции мРНК и прекращению синтеза белка, в результате отсутствует весь гликопротеиновый комплекс и развивается синдром Бернара-Сулье, для которого характерны геморрагические осложнения [4]. Ряд мутаций гена GP Ibα также является причиной синдрома Бернара-Сулье, либо болезни Виллебранда.

Представляют интерес полиморфизмы гена GP Ibα, которые связаны с риском развития артериальных тромбозов. Первый является результатом различного числа тандемных повторов (VNTR) и образует четыре аллельных варианта – D, C, B, A. Второй полиморфизм обусловлен точечной заменой C на T в 3550 позиции, вследствие чего триптофан меняется на метионин в 145 положении аминокислотной последовательности белка (Thr145Met). Эти мутации сцеплены друг с другом и увеличивают риск развития инфаркта миокарда и инсульта почти в 3 раза, но не оказывают никакого влияния на возникновение венозных тромбозов [5]. Другой полиморфизм гена GP Ibα отвечает не за изменение его функциональных качеств, а за количественные показатели – плотность рецепторного комплекса на поверхности тромбоцитов. Данный полиморфизм представляет собой замену T на C в (-5) положении от ATG-кодона гена GP Ibα, он локализован внутри специфичной нуклеотидной последовательности “Kozak” [6]. Наличие C в этой позиции увеличивает поверхностную экспрессию комплекса GP Ib-IX-V и может выступать фактором риска гиперагрегации тромбоцитов [7].

Известно, что тромбоциты при активации способны к синтезу белков *de novo* [8]. При этом изначально при формировании тромбоцитов из мегакариоцита в цитоплазму отделяющихся клеток попадает пре-мРНК, и её преобразование в мРНК происходит при активации клеток различными индукторами [8, 9]. В настоящее время исследование экспрессионного профиля тромбоцитов с помощью микрочиповой технологии (microarray) и метода анализа генной экспрессии SAGE (serial analysis of gene expression) выявило от 1500 до 3000 уникальных транскриптов [10]. Также были показаны отличия в экспрессионном профиле тромбоцитов пациентов с различным течением ишемической болезни сердца [11]. Антиагрегантная терапия, в том числе ацетилсалициловой кислотой (АСК), направлена на подавление функциональной активности тромбоцитов, однако нет данных о влиянии антиагрегантной терапии на пре-мРНК, мРНК и экспрессионный профиль тромбоцитов.

Таким образом, анализ качественных и количественных характеристик ключевого тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда, определяющего взаимодействие тромбоцитов с сосудистой стенкой, имеет фундаментальное и практическое значение в понимании патогенеза развития цереброваскулярных заболеваний и определении новых путей генетически обоснованной фармакологической коррекции данных заболеваний.

Целью данного исследования явилось определение роли тромбоцитарного рецептора для фактора Виллебранда в активации тромбоцитов у больных с цереброваскулярными заболеваниями. В задачи исследования входило: 1) определить роль генетических вариантов Thr145Met и T(-5)C GP Ibα в активации тромбоцитов и развитии цереброваскулярных заболеваний, 2) оценить вклад количественных характеристик рецептора для фактора Виллебранда (уровень экспрессии гена GP Ibα и количество рецепторов на поверхности клеток) в активацию тромбоцитов и развитие цереброваскулярных заболеваний; 3) проанализировать влияние антиагрегантной терапии АСК на уровень пре-мРНК и мРНК в тромбоцитах больных с цереброваскулярными заболеваниями.

МЕТОДИКА

В исследование включены 123 пациента (средний возраст 56±1 лет, 60 (49%) женщин и 63 (51%) мужчины), перенесшие ишемический инсульт (ИИ) на фоне макроангиопатии сосудов головного мозга (41 человек), микроангиопатии сосудов головного мозга (41 человек) и с хронической ишемией головного мозга (ХИГМ) вследствие патологической извитости сосудов головного мозга, соответствующей начальным проявлениям недостаточного мозгового кровообращения или дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) I и II степени (41 человек). Неврологический осмотр выполняли по стандартной методике. Проводилась оценка состояния пациентов на момент поступления и при выписке по общепринятым шкалам в баллах: шкале инсульта Американского национального института здоровья (NIHSS), которая характеризует основные нарушения при церебральном инсульте, и шкале Ранкина, которая позволяет оценить степень инвалидизации в повседневной жизни. В исследование не включали пациентов с сопутствующими хроническими заболеваниями головного мозга (рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, опухоли); заболеваниями системы крови: полицитемией, идиопатической тромбоцитемией, тромбоцитопенией, тромбастенией; с наличием хронической почечной недостаточности с проведением гемодиализа; а также постоянно принимающих антидепрессанты из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. Компьютерная томография (КТ) или магнитно-резонансная томография (МРТ) головного мозга проводилась всем больным на 2-5 день от развития заболевания для верификации очага ишемии в веществе мозга, оценки его локализации и размеров.

В качестве антиагрегантной терапии 68 пациентов получали АСК (100 мг/день).

Контрольную группу составили 95 добровольцев (средний возраст 56±2 лет, 42 (44%) женщины и 55 (56%) мужчин) без цереброваскулярных, сердечно-сосудистых и тромботических заболеваний в анамнезе, не принимавшие какие-либо лекарственные препараты, влияющие на функциональную активность тромбоцитов.

Исследуемые группы не отличались по возрасту и гендерному составу.

Все лица, включённые в исследование, дали добровольное информированное согласие.

Для анализа генетических вариантов Thr145Met и T(-5)C GP Ibα у исследуемых лиц был осуществлён забор крови из локтевой вены в вакутейнеры, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. ДНК выделяли из лейкоцитов крови наборами для выделения "Рапид-Генетика" ("ДНК-технология", Россия) согласно прилагаемой инструкции. Идентификацию генетических вариантов Thr145Met и T(-5)C GP Ibα проводили методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом, используя праймеры описанные ранее [12, 13] и эндонуклеазы рестрикции Hin 1I и Ava II ("ThermoScientific", Литва), соответственно.

Для исследования функциональной активности тромбоцитов и анализа количества рецепторов на поверхности тромбоцитов использовали богатую тромбоцитами плазму (БТП), которую получали из цельной венозной крови, забранной в вакутейнеры с 3,2% цитратом Na. Исследования функциональной активности тромбоцитов и анализ количества рецепторов на поверхности клеток проводились не позднее 3 ч с момента взятия биоматериала.

Подсчёт количества тромбоцитов (PLT) осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе LH 500 ("BeckmanCoulter", США). MPV (средний объём тромбоцита) рассчитывали автоматически с использованием калибровочной константы из гистограммы распределения тромбоцитов.

Анализ функциональной активности тромбоцитов проводили методом стандартной агрегатометрии по Борну на анализаторе агрегации тромбоцитов АР 2110 SOLAR (НПФ "SOLAR", Белоруссия), используя БТП пациентов и доноров. В качестве индуктора активации применяли ADP в концентрации 2,5 мкМ, 5 мкМ и 10 мкМ. При анализе агрегатограмм результат оценивали по изменению степени светопропускания (T, %) в точке максимума (то есть максимальная степень агрегации тромбоцитов), а также по скорости агрегации (V, %/мин) через 30 сек после добавления индуктора.

Содержание гликопротеина GP Ibα на поверхности тромбоцитов определяли методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченых моноклональных антител VM16d-FITC, предоставленных заведующим лаборатории клеточной адгезии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Росмедтехнологий д.м.н., профессором Мазуровым А.В., на проточном цитометре CYTOMICS FC 500 ("BeckmanCoulter"). Цитометрическое исследование проводили в цельной венозной крови, забранной в вакуумную пробирку с 3,2% цитратом Na, разведённой в 50 раз однократным фосфатным буфером (1×PBS). Для окрашивания флуоресцентно мечеными антителами 40 мкл разведённой крови инкубировали с 5 мкл – VM16d-FITC (2 мг/мкл) в течение 15 мин при комнатной температуре, далее добавляли 455 мкл 1×PBS, и анализировали образцы на проточном цитометре. В качестве отрицательного контроля использовали антитела к мышиному иммуноглобулину, меченные FITC. Маркер CD61-FITC ("BeckmanCoulter"), специфичный для тромбоцитов, использовали для точного выделения пула данных клеток на цитограмме. Количество GP Ibα на поверхности тромбоцитов оценивали по величине средней интенсивности флуоресценции (MFI).

Для отделения тромбоцитарной массы использовали безлейкоцитарную БТП. Для удаления лейкоцитов из БТП был использован специальный набор реагентов Dynabeads CD45 Pan Leucocyte ("InvitrogenDynal AS", Норвегия) и негативное выделение, при котором целевые клетки не связываются с антителами и магнитыми частицами и остаются жизнеспособными. Магнитные частицы отмывали и готовили к использованию согласно протоколу к набору Dynabeads CD45 PanLeucocyte, используя буфер PBS+0,1% BSA+2 мМ EDTA (pH 7,4). Далее к 1 мл БТП добавляли подготовленные магнитные частицы и инкубировали 30 мин при +2-8°C при лёгком перемешивании, помещали пробирки в магнитный штатив на 2 мин, супернатант, содержащий суспензию тромбоцитов без примеси лейкоцитов, центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин, супернатант сливали. Из полученной массы тромбоцитов выделяли РНК с использованием набора для выделения РНК RNeasy MiniKit ("Qiagen", США), согласно прилагаемой инструкции. Для получения кодирующей ДНК (кДНК) использовали набор для обратной транскрипции RevertAid First Strandc DNA Synthesis Kit ("ThermoScientific"), согласно прилагаемой инструкции. Все манипуляции производили на льду. Для исключения контаминации геномной ДНК выделенную РНК перед стадией обратной транскрипции обрабатывали ферментом DNase I ("ThermoScientific"), согласно прилагаемой инструкции.

Для определения уровня пре-мРНК и зрелой матричной РНК (мРНК) в тромбоцитах был применён метод ПЦР в реальном времени (RT-PCR) с использованием TaqMan технологии на амплификаторе ДТ-96 ("ДНК-технология"). В качестве референсного гена был выбран конститутивно экспрессирующийся в клетках β-актин. Для анализа содержания пре-мРНК и зрелой мРНК в тромбоцитах были оригинально сконструированы праймеры и флуоресцентно меченые олигонуклеотидные пробы, специфичные к экзон-экзонному стыку (зрелая мРНК) или

фрагменту интрона (пре-мРНК) с использованием программного обеспечения Primer Express software, основываясь на нуклеотидной последовательности из базы данных Gen-Bank: F1: 5'-TCGAGTGGCACC-CTAGAAGAC-3', R1: 5'-GCAGCAGGAGCAGCAA-GAG-3', P1: FAM-AGGTCTTTCTGCCTGCCTGTC-CTCATG-RTQ1, F2: 5'-TCGAGTGGCACCCTAGAA-GAC-3', R2: 5'-CACCAACCCCGGCTTACAG-3', P2: FAM-TCTGTGCCTTCGGAGGTCTTTCTG CC-RTQ1 – для экзона и интрона GP Ibα, соответственно. Праймеры и зонды для гена β-актина были описаны ранее в литературе [14]. Количество пре-мРНК и зрелой мРНК гена GP Ibα проанализировано у 12 доноров и 21 пациента. Мы разделили всех индивидуумов, у которых было проанализировано количество пре-мРНК и мРНК гена GP Ibα, в зависимости от приема антиагрегантов – 19 человек не принимали лекарственные препараты, влияющие на функциональную активность тромбоцитов, и 14 человек принимали АСК в дозе 100 мг/день.

Результаты обрабатывали с использованием стандартного пакета статистической программы Statistica 7.0. Средние величины приведены со стандартной ошибкой среднего. Для сравнения средних значений использовали непараметрические методы – U-тест Манн-Уитни, тест медиан Крускал-Уиллиса и тест Вилкоксона. Корреляции между параметрами анализировались по Спирману. Достоверность различий частотных распределений анализируемых аллелей между исследуемыми группами определяли точным методом Фишера ($p<0,05$ принимали за значимый уровень достоверности).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество тромбоцитов и MPV достоверно не различалось в исследованных группах. Оно составило $(232\pm5)\times10^3$ кл./мкл и $(237\pm12)\times10^3$ кл./мкл у пациентов и в контрольной группе, соответственно ($p>0,05$), MPV – 9,1±0,7 и 8,6±0,3 у пациентов и в контрольной группе, соответственно ($p>0,05$).

Распределение генотипов в исследованных группах, представленное в таблице 1, соответствует таковому в описанных европейских популяциях: 13%-22% у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и 10%-15% у здоровых лиц для ThrMet+MetMet генотипов и 34% и 24% для TC+CC генотипов у пациентов с цереброваскулярной патологией и здоровых лиц контрольной группы, соответственно [15]. Нами не обнаружено различий в частоте генотипов Thr145Met и T(-5)C GP Ibα между исследованными группами пациентов с цереброваскулярной патологией и контрольной группой. Была выявлена несколько большая частота аллеля145Met GP Ibα у больных, перенесших ИИ на фоне макроангиопатии сосудов головного мозга по сравнению с пациентами, перенесшими ИИ на фоне микроангиопатии, или с ХИГМ вследствие патологической извитости сосудов головного мозга. Объяснить действие указанного генетического варианта можно, рассмотрев строение рецептора GP Ib-IX-V. Данный полиморфизм, во-первых, сцеплен с числом тандемных повторов (VNTR). Вариабельность числа тандемных повторов в гене GP Ibα определяет различную длину "ножки" субъединицы Ibα, а более длинная "ножка" обеспечивает более эффективное связывание с лигандом. Во-вторых, сама замена Thr145Met приводит к более прочной связи лиганда с рецептором. Эти факторы и определяют "заякоревание" тромбоцита на поврежденной эндотелиальной поверхности даже при высоких скоростях сдвига, что наблюдается в артериальном русле [4, 5]. Логично ожидать большую частоту Thr145Met GP Ibα у пациентов с ИИ на фоне микроангиопатии и ХИГМ вследствие патологической извитости, то есть в ситуациях с максимально высокой скоростью сдвига, однако мы получили противоположные результаты. Ранее было показано превалирование аллеля 145Met GP Ibα у мужчин, перенесших инфаркт миокарда в возрасте до 45 лет [16]. Интересным является исследование, выполненное в Финляндии (Helsinki Sudden Death Study), в которое были включены 700 мужчин, умерших внезапной смертью, из них – 230 от ИМ. Данное исследование продемонстрировало высокий риск смерти от ИМ у носителей аллеля 145Met GPIbα – риск возрастал в 8,8 раз и был

Таблица 1. Распределение генотипов и частота полиморфного аллеля Thr145Met и T(-5)C GP Ibα в исследованных группах пациентов и здоровых добровольцев.

Исследованные группы	Частота генотипа, % (n)					
	Thr145Met GP Ibα			T(-5)C GP Ibα		
	ThrThr	ThrMet+MetMet	Аллель Met, %	TT	TC+CC	Аллель C, %
Здоровые добровольцы	84 (80)	15+1 (14+1)	8,4	76 (25)	24+0 (8+0)	12,1
ИИ на фоне макроангиопатии	73 (30)	22+5* (9+2)	15,9	76 (31)	24+0 (10+0)	12,2
ИИ на фоне микроангиопатии	88 (36)	10+2 (4+1)	7,3	66 (27)	34+0 (14+0)	17,1
ХИГМ вследствие извитости сосудов	90 (37)	10+0 (4+0)	4,9	83 (34)	17+0** (7+0)	8,5

Примечание: Частота генотипа указана в %, цифры в скобках - абсолютное число носителей данного генотипа, носители полиморфного аллеля в гетеро- и гомозиготном состоянии суммированы (+). * - p=0,04 vs. "ХИГМ вследствие извитости сосудов"; ** - p=0,06 vs. "ИИ на фоне микроангиопатии".

максимален для мужчин в возрасте до 55 лет [17]. Таким образом, полученные нами результаты по накоплению аллеля Met145 GPIbα в группе пациентов, перенесших ИИ на фоне макроангиопатии, согласуются с данными об ассоциации данного полиморфизма с повышением риска развития артериальных тромбозов [5].

Также наблюдалась меньшая частота аллеля (-5)C GP Ibα у пациентов с ХИГМ вследствие патологической извитости по сравнению с больными ИИ на фоне микро- и макроангиопатии сосудов головного мозга, однако различия не достигли статистически значимого уровня, возможно вследствие недостаточного объёма выборки.

Количество гликопротеина GP Ibα на поверхности тромбоцитов статистически не различалось у пациентов и здоровых добровольцев (табл. 2). При этом у всех обследованных лиц наблюдалась обратная корреляция между количеством GP Ibα и скоростью агрегации тромбоцитов: R=-0,25 (p=0,01) при индукции 10 мкМ ADP, R=-0,19 (p=0,03) при индукции 5 мкМ ADP, R=-0,16 (p=0,05) при индукции 2,5 мкМ ADP. Таким образом, чем выше функциональная активность тромбоцитов у исследуемых индивидуумов, тем меньше рецепторных комплексов GP Ib-IX-V детектируется на поверхности клетки. Этот феномен является особенностью данного рецепторного комплекса, и был описан ранее [18].

В то же время количество гликопротеина GP Ibα на поверхности тромбоцитов у пациентов с цереброваскулярной патологией коррелировало с величиной MPV (R=0,27, p=0,003). Ранее подобная зависимость была показана для больных с острым коронарным синдромом (ОКС) и здоровых доноров [19].

Исследованные генетические варианты Thr145Met и T(-5)C GP Ibα не влияли на увеличение количества гликопротеина GP Ibα на поверхности тромбоцитов пациентов с цереброваскулярными заболеваниями. Эти результаты согласуются с аналогичными исследованиями у больных с ОКС [20]. Более того, носители аллеля (-5)C GP Ibα имели достоверно меньшее количество GP Ibα, измеренное методом проточной цитометрии (табл. 3). Также не влиял полиморфизм T(-5)C GP Ibα на увеличение уровня экспрессии гена GP Ibα (табл. 3). Эти данные отличаются от таковых, описанных в статье Afshar-Kharghan V. и соавт. [7]. Возможно, это связано с исследуемой выборкой: в нашей работе были проанализированы пациенты с цереброваскулярной патологией, в то время как в статье Afshar-Kharghan V. и соавт. рассматривалась экспрессионная клеточная модель и носители полиморфизма T(-5)C GP Ibα без каких-либо сердечно-сосудистых заболеваний. Следует отметить, что другие авторы также не показали влияния T(-5)C GP Ibα на плотность рецепторного комплекса для фактора Виллебранда и уровень экспрессии гена GP Ibα [21-23].

При анализе уровня экспрессии гена GP Ibα не выявлено достоверных различий в количестве пре-мРНК и зрелой мРНК между пациентами и контрольной группой. Тем не менее, количество зрелой мРНК было несколько больше у добровольцев по сравнению с исследованными больными (табл. 4). Так как преобразование пре-мРНК в зрелую мРНК происходит при активации тромбоцитов, мы предположили, что этот процесс блокирован у пациентов с цереброваскулярной патологией вследствие приема антиагрегантных препаратов. У лиц, принимающих АСК, уровень зрелой мРНК был достоверно ниже по сравнению

Таблица 2. Количество рецепторов для фактора Виллебранда в исследованных группах пациентов и здоровых добровольцев.

Исследованные группы	Количество рецепторов для фактора Виллебранда		
	Среднее ± ошибка	Минимум	Максимум
Здоровые добровольцы	4,41±0,20	0,81	7,23
ИИ на фоне макроангиопатии	4,05±0,20	0,99	5,76
ИИ на фоне микроангиопатии	4,07±0,18	1,5	6,87
ХИГМ вследствие извитости сосудов	4,01±0,19	1,39	6,01

Таблица 3. Количество рецепторов для фактора Виллебранда, уровень экспрессии гена GP Ibα и количество тромбоцитов у пациентов в зависимости от генотипов Thr145Met и T(-5)C GP Ibα.

Генотипы GP Ibα		Исследуемые параметры, среднее ± ошибка		
		Количество GP Ibα	пре-мРНК GP Ibα	МРНК GP Ibα
Thr145Met	ThrThr	4,07±0,11	17,6±7,8	1406±866
	ThrMet+MetMet	3,82±0,30	4,7	808
T(-5)C	TT	4,20±0,11	21,4±11,6	1838±1327
	TC+CC	3,55±0,27*	9,76±5,80	648±352

Примечание: * - p=0,008 vs. TT.

Таблица 4. Уровень экспрессии гена GP Ibα у пациентов с цереброваскулярными заболеваниями и в контрольной группе здоровых добровольцев.

Группы / Экспрессия	Пациенты	Контрольная группа
пре-мРНК	9±4	30±19
мРНК	498±222	2894±2194

Таблица 5. Уровень экспрессии гена GP Ibα и параметры функциональной активности тромбоцитов у пациентов, принимающих АСК, и у лиц в отсутствие антиагрегантной терапии.

Исследуемые параметры	Антиагрегантная терапия		Достоверность различий, p
	АСК +	АСК −	
пре-мРНК	13±6	20±12	0,07
мРНК	150±46	2268±1393	0,025
T,% (10 мкМ АДФ)	77±5	80±3	0,03
T,% (5 мкМ АДФ)	68±4	72±3	0,01
T,% (2,5 мкМ АДФ)	57±3	62±3	0,16
V,%/мин (10 мкМ АДФ)	30±2	37±2	0,03
V,%/мин (5 мкМ АДФ)	27±1	36±2	0,0008
V,%/мин (2,5 мкМ АДФ)	24±1	32±2	0,002

с индивидуумами, не получающими антиагрегантного препарата, в то время как уровень пре-мРНК практически не различался (табл. 5). Функциональная активность тромбоцитов у пациентов на фоне антиагрегантной терапии была достоверно ниже по сравнению с лицами, не принимающими АСК (табл. 5). Кроме того, уровень зрелой мРНК напрямую коррелировал со степенью ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов: R=0,56 (p=0,01) при индукции 10 мкМ ADP, R=0,49 (p=0,0065) при индукции 5 мкМ ADP, R=0,37 (p=0,04) при индукции 2,5 мкМ ADP, что полностью подтверждает тезис о преобразовании пре-мРНК в зрелую мРНК в активированных тромбоцитах [8, 9].

В ряде работ был показан синтез в тромбоцитах белков, секретирущихся из α-гранул – фибриногена, тромбоспондина, фактора Виллебранда, важных компонентов системы гемостаза – тканевого фактора и ингибитора активатора плазминогена типа 1, интерлейкина IL-1β, циклооксигеназы 1 [8]. Анализ литературы показывает безусловный интерес исследователей к проблеме синтеза белков в тромбоцитах, однако только одно исследование посвящено в этой связи тромбоцитарному рецептору для фибриногена [24]. В то же время тромбоцитарный рецепторный аппарат играет ведущую роль во всех физиологических процессах, реализуемых тромбоцитами – гемостаз и тромбообразование, ангиогенез, иммунный ответ, репарация поврежденного эндотелия. Мы впервые показали изменение количества пре-мРНК и зрелой мРНК гена GP Ibα – ключевой субъединицы рецептора тромбоцитов для фактора Виллебранда, в зависимости от блокирования функциональной активности тромбоцитов антиагрегантной терапией ацетилсалициловой кислотой.

Таким образом, на основании проведённого исследования можно заключить: 1) полиморфный аллель 145Met GP Ibα чаще встречается у пациентов, перенесших ишемический инсульт на фоне макроангиопатии сосудов головного мозга; 2) в активированных тромбоцитах пре-мРНК гена GP Ibα преобразуется в зрелую мРНК, и этот процесс блокируется приёмом антиагрегантных препаратов ацетилсалициловой кислоты.

Работа поддержана РФФИ (грант №12-04-01296-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Верещагин Н.В., Пирадов М.А., Суслина З.А.* (2002) Инсульт. Принципы диагностики, лечения и профилактики. Краткое руководство для врачей, Москва.
2. *Alberts M.J.* (2002) Cerebrovasc. Dis., **13** (Suppl.1), 12-16.
3. *Скворцова В.И.* (2004) Качество жизни. Медицина, **4**(7), 10-12.
4. *Lopez J.A., Andrews R.K., Afshar-Kharghan V., Berndt M.C.* (1998) Blood, **91**, 4397-4418.
5. *Gonzalez-Conejero R., Lozano M.L., Rivera J., Corral J., Iniesta J.A., Moraleda J.M., Vicente V.* (1998) Blood, **92**, 2771-2776.
6. *Kaski S., Kekomaki R., Partanen J.* (1996) Immunogenetics, **44**, 170-176.
7. *Afshar-Kharghan V., Li C.Q., Khoshnevis-Asl M., Lopez J.A.* (1999) Blood, **94**, 186-191.
8. *Weyrich A., Schwertz H., Kraiss L.W., Zimmerman G.A.* (2009) J. Thromb. Haemost., **7**, 241-246.
9. *Denis M.M., Tolley N.D., Bunting M., Schwertz H., Jiang H., Lindemann S., Yost C.C., Rubner F.J., Albertine K.H., Swoboda K.J., Fratto C.M., Tolley E., Kraiss L.W., McIntyre T.M., Zimmerman G.A., Weyrich A.S.* (2005) Cell, **122**, 379-391.

10. *Dittrich M., Birschmann I., Pfrang J., Herterich S., Smolenski A., Walter U., Dandekar T.* (2006) Thromb. Haemost., **95**, 643-651.
11. *Healy A.M., Pickard M.D., Pradhan A.D., Wang Y., Chen Z., Croce K., Sakuma M., Shi C., Zago A.C., Garasic J., Damokosh A.I., Dowie T.L., Poisson L., Lillie J., Libby P., Ridker P.M., Simon D.I.* (2006) Circulation, **113**, 2278-2284.
12. *Ishida F., Furihata K., Ishida K., Yan J., Kitano K., Kiyosawa K., Furuta S.* (1995) Blood, **86**, 1357-1360.
13. *Douglas H., Michaelides K., Gorog D.A., Durante-Mangoni E., Ahmed N., Davies G.J., Tuddenham E.G.* (2002) Heart, **87**(1), 70-74.
14. *Czermak C., Lehofer M., Wagner E., Prietl B., Lemonis L., Rohrhofer A., Schanenstein K., Liebmann P.* (2004) Addiction, **99**, 251-257.
15. *Baker R.I., Eikelboom J., Lofthouse E., Staples N., Afshar-Khargham V., Lopez J.A., Shen Y., Berndt M.C., Hankey G.* (2001) Blood, **98**, 36-40.
16. *Пчелина С.Н., Сироткина О.В., Шейдина А.М., Тараскина А.Е., Родыгина Т.И., Демина Е.П., Заботина А.М., Митупова М.И., Баженова Е.А., Беркович О.А., Шляхто Е.В., Шварцман А.Л., Шварц Е.И.* (2007) Кардиология, **7**, 29-34.
17. *Mikkelsson J., Perola M., Pettila A., Karhunen P.J.* (2001) Circulation, **104**, 876-880.
18. *Мазуров А.В.* (2011) Физиология и патология тромбоцитов, Литтерра, Москва.
19. *Хаспекова С.Г., Зюряев И.Т., Якушкин В.В., Наймушин Я.А., Сироткина О.В., Зайцева Н.О., Руда М.Я., Мазуров А.В.* (2014) Биомед. химия, **60**(1), 94-108.
20. *Khaspekova S.G., Zyuryaev I.T., Yakushkin V.V., Sirotkina O.V., Zaytseva N.O., Ruda M.Y., Panteleev M.A., Mazurov A.V.* (2014) Blood Coagul. Fibrinolysis, **25**, 128-134.
21. *Huang T., Sahud M.A.* (2003) Thromb. Res., **112**, 147-150.
22. *Jilma-Stohlawetz P., Homoncik M., Jilma B., Knechtelsdorfer M., Unger P., Mannhalter C., Santoso S., Panzer S.* (2003), Br. J. Haematol., **120**(4), 652-655.
23. *Corral J., Lozano M.L., González-Conejero R., Martínez C., Iniesta J.A., Rivera J., Vicente V.* (2000) Thromb. Haemost., **83**(1), 23-28.
24. *Pabla R., Weyrich A.S., Dixon D.A., Bray P.F., McIntyre T.M., Prescott S.M., Zimmerman G.A.* (1999) J. Cell. Biol., **144**, 175-184.

Поступила: 20. 01. 2014.

THE MOLECULAR MECHANISMS OF PLATELETS ACTIVATION IN PATIENTS WITH CEREBROVASCULAR DISEASE

O.V. Sirotkina[1,2,3], A.B. Laskovets[3], V.V. Goldobin[3], A.A. Topanova[3], D.V. Karelov[1,4], T.V. Vavilova[2,3]

[1]National Research Centre "Kurchatov institute", B.P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Orlova Roshcha str., Gatchina, Leningrad district, 188300 Russia; fax: (813-71)323-03; e-mail: olga_sirotkina@mail.ru
[2]Federal Almazov North-West Medical Research Centre, 2 Akkuratova str, St. Petersburg, 197341 Russia
[3]Mechnikov North-Western State Medical University, 41,Kirochnaya str., St. Petersburg, 191015 Russia
[4]St.Petersburg State Polytechnical University, 29 Politehnicheskaya str., St. Petersburg, 195251 Russia

Cerebrovascular disease is a main cause of mortality and one of the big medical problems. After the vascular wall's damage the endothelial cells secrete the von Willebrand factor which then connects with its platelet's receptor GP Ib-V-IX. There are two polymorphisms Thr145Met and T(-5)C of the GP Ibα gene associated with arterial thrombosis development. Also the difference in platelets' genes expressions was shown in patients with various clinical course of ischemic heart disease. The aim of this study was to investigate the role of platelet's receptor for von Willebrand factor in platelets' activation in patients with cerebrovascular disease. 123 patients with cerebrovascular disease and 97 healthy donors were included into the study. We analyzed the level of receptor for von Willebrand factor on platelet's membrane by flow cytometry, Thr145Met and T(-5)C GP Ibα polymorphiams by PCR-RFLP, the GP Ibα gene expression by RT-PCR and ADP-induced platelet aggregation by Born method. We have shown: 1) the 145Met GP Ibα allele prevalence in patients with atherotrombotic stroke development due to macroangiopathy; 2) the pre-mRNA transform into the mature mRNA in activated platelets and this process may be stopped by the antiplatelet therapy by acetylsalicylic acid.

Key words: receptor for von Willebrand factor, GP Ibα gene, Thr145Met and T(-5)C GP Ibα gene polymorphisms, pre-mRNA Ibα, mature mRNA Ibα