УДК 612.1:577.213.7

Витковский Ю.А., Гергесова Е.Е., Страмбовская Н.Н.

ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ GpIa (C807-T) И GpIIIa (Leu33Pro) У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ ОБЛАДАТЕЛЕЙ РАЗНЫХ ГРУПП КРОВИ АВ0

ГОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г.Чита

У здоровых лиц с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0 изучено влияние генетического полиморфизма тромбоцитарных рецепторов GpIa (C807-T) и GpIIIa (Leu33-Pro) на функции тромбоцитов. Установлено, что гомозиготный мутантный вариант 807T коллагенового рецептора тромбоцитов GpIa чаще встречается у обладателей II (A) группы крови по сравнению с I (0), а нормальный гомозиготный 807C-генотип - реже. Среди носителей сочетания мутаций тромбоцитарных рецепторов преобладают лица со II (A) группой крови. При этом у носителей аномальных аллелей тромбоцитарных рецепторов и их сочетания ослабляется адгезивность тромбоцитов на лимфоцитах и усиливается агрегационная функция кровяных пластинок.

Ключевые слова. *Тромбоциты; полиморфизм генов GpIa, GpIIIa; группы крови АВ0; лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия.*

Vitkovsky Yu.A., Gergesova E.E., Strambovskaya N.N.

PLATELET FUNCTION AND GpIa(C807-T) AND GpIIIa(Leu33Pro) GENE POLYMORPHISM IN HEALTHY SUBJECTS WITH DIFFERENT AB0 BLOOD GROUPS

The effect of GpIa(C807-T) and GpIIIa(Leu33Pro) gene polymorphism on platelet function in healthy subjects with different AB0 blood groups was studied. 807T allele of GpIa(C807-T) GpIa(C807-T) gene was shown to be more common in people with II (A) blood group compared with subjects with I (0) blood group, with 807T variant being less common. Prevalence of subjects with II (A) blood group among carriers of combined mutations was noted. Increased platelet aggregation and decreased platelet adhesiveness to lymphocytes was found in carriers of abnormal alleles and combined mutations of platelet receptors.

Key words*: platelets, GpIa(C807-T) and GpIIIa(Leu33Pro) gene polymorphism, AB0 blood groups, lymphocyte-platelet adhesion*

Введение. В настоящее время не вызывает сомнений существование единой клеточно-гуморальной системы защиты организма, объединяющей иммунитет и гемостаз [1-3,7-11,20,21], одним из способов реализации свойств которой является функция лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии [11]. Изучена молекулярная база [1,2,9,11,21], накоплены данные о роли ЛТА в патогенезе различных заболеваний [4,12,13]. Однако к настоящему моменту нет данных о возможных генных механизмах регуляции этой физиологической функции, существование которых, тем не менее, бесспорно. Кроме того, показатель ЛТА, а, в особенности, лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ), отражающий адгезивность тромбоцитов на лимфоцитах, позволяет характеризовать и функциональное состояние кровяных пластинок, чему в доступной литературе уделено недостаточно внимания. Функции же тромбоцитов зависят как от генетических [16,18,23], так и от некоторых конституциональных факторов, например групп крови АВ0 [6,14,15,17,19,22]. В свою очередь, функция лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии в норме у лиц с различной групповой принадлежностью крови АВ0 не изучалась. Таким образом,

представляется интересным изучить особенности функции лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии и агрегации тромбоцитов в связи с генетическими особенностями тромбоцитарных рецепторов у здоровых лиц с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0.

Целью данного исследования явилось изучение генетического полиморфизма тромбоцитарных рецепторов GpIa (C807-T) и GpIIIa (Leu33-Pro) и его роли в изменении функций тромбоцитов у здоровых лиц с различной групповой принадлежностью крови по системе АВ0.

Материалы и методы исследования. В работе с обследуемыми лицами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации, World Medical Association Declaration of Helsinki (1964). Объектом наблюдения явились образцы цельной цитратной крови здоровых людей в возрасте 18-35 лет (200 образцов). Определение показателя лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии проводили по методике Ю.А. Витковского [2], лимфоцитарно-тромбоцитарный индекс (ЛТИ) оценивали как среднее арифметическое количество тромбоцитов, присоединившихся к одному лимфоциту. Оценку агрегационной способности тромбоцитов осуществляли турбидиметрическим методом по G. Born (1962) с помощью лазерного анализатора агрегации Biola (НПФ "Биола", Москва): исследовали спонтанную, АДФ-, адеранлин- и коллаген-индуцированную агрегацию с использованием соответствующих реактивов, выпускаемых ООО "Технология-стандарт" (Барнаул). Дозы индукторов составляли: АДФ - 5 мгк/мл, адреналин - 5 мкг/мл, коллаген - 1 мг/мл. Группы крови АВ0 определялись общепринятым методом с использованием реакции изогемагглютинации на планшете при помощи цоликлонов анти-А и анти-В (ООО "Гематолог", Россия, Москва). Выделение ДНК из цельной крови и постановка ПЦР с целью выявления протромботических мутаций генов GpIIIa (Leu33-Pro) и GpIa (C807-T) проводились с использованием соответствующих наборов, выпускаемых НПФ "Литех" (Москва). Детекция продуктов амплификации осуществлялась путем горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле. Статистическая обработка результатов выполнена параметрическими и непараметрическими методами с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2007, STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США), с определением статистической значимости различий при достигнутом уровне значимости $p<0,05$. Изучаемые показатели представлены в виде средних величин со стандартным отклонением (M±SD). При нормальном распределении признака (правило "трех сигм") применялся критерий Стьюдента (t-тест), при отличном от нормального распределении признака - критерий Манна-Уитни (U-тест). Для сравнения групп по качественному бинарному признаку применялся критерий $\square^2$ (Пирсона).

Результаты исследования. В группе здоровых лиц обнаружено 135 33Leu-гомозигот (R=0,68) тромбоцитарного рецептора фибриногена GPIIIa (интегрина $\square_3$), 42 Leu33Pro- гетерозиготы (R=0,21), 23 33Pro-гомозиготы (R=0,11). Полиморфные варианты тромбоцитарного рецептора коллагена GPIa (интегрина $\square_2$) распределились следующим образом: 105 807T-гомозиготы (R=0,52), 46 C807T-гетерозиготы (R=0,22) и 49 807T-гомозигот (R=0,24). Среди испытуемых обладатели I (0) группы крови составили 36%, II (A) - 30%, III (B) - 26% и IV (AB) - 8%. Полученные данные о группах крови соответствуют сведениям, имеющимся в литературе для Европейской части России [5].

По причине малого количества испытуемых обладатели IV(AB) группы из наблюдений были исключены. Обнаружено, что частоты встречаемости полиморфных вариантов гена тромбоцитарного рецептора фибриногена GpIIIa (интегрина $\square_3$) у обладателей разных групп крови не

различались, в то время как частота встречаемости гомозиготного мутантного варианта 807Т коллагенового рецептора тромбоцитов интегрина $\square_2$ оказалась выше у обладателей второй группы крови по сравнению с первой. Вместе с тем носительство нормального гомозиготного генотипа обнаружилось у них реже (рис.1).

Среди носителей сочетания мутаций тромбоцитарных рецепторов преобладали лица со II (А) группой крови (табл.1).

Таблица 1

Частота встречаемости (R) разных групп крови АВ0 у здоровых лиц носителей сочетания мутантных аллелей тромбоцитарных рецепторов GpIa (C807-T) и GpIIIa (Leu33-Pro)

I (0) n=7	II (A) n=9	III (B) n=8
0,13	0,23 p<0,05	0,09

Примечание: $\square^2$-тест, р -статистическая значимость различий по сравнению с первой группой крови.

Скорость спонтанного образования тромбоцитарных агрегатов оказалась увеличена у здоровых лиц со II (А) группой крови (средний радиус агрегатов в I (0) группе 1,1±0,1отн.ед., во II (А) - 1,4±0,1отн.ед.; скорость их образования в I (0) группе 0,4±0,1 отн.ед./мин., во II (А) - 0,7±0,1 отн.ед./мин; t-тест, p<0,05). Кроме того, у обладателей II (А) и III (В) групп, по сравнению с I (0), агрегация оказалась повышенной, если в качестве лиганда использовался коллаген (средний радиус агрегатов в I, II и III группах соответственно 6,7±2,5, 7,3±1,9 и 8,5±1,6 отн.ед.; скорость их образования 19,1±4,7, 15,9±3,2 и 24,6±5,2 отн.ед./мин.; по показателю светопропускания - 53,5±11,8, 73,4±12,0 и 66,1±14,1%; 65,9±15,5, 85,7±15,0 и 92,0±15,6%/мин.; t-тест, p<0,05).

Обнаружено, что у здоровых лиц носителей мутантного гомозиготного 807Т аллеля GpIa ослаблена способность тромбоцитов взаимодействовать с лимфоцитами (ЛТИ), в то время как процент лимфоцитарно-тромбоцитарных коагрегатов в циркуляции не зависит от генетического полиморфизма коллагенового рецептора тромбоцитов. Кроме того, гетерозиготный аллель не оказывает влияния на функцию лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии (табл.3). При этом скорость спонтанной агрегации кровяных пластинок оказалась выше у здоровых лиц носителей 807Т варианта (скорость спонтанного образования агрегатов из тромбоцитов у 807С-гомозигот, 807СТ-гетерозигот и 807Т-гомозигот составила соответственно 0,3±0,1, 0,3±0,1 и 0,7±0,2 отн.ед./мин; U-тест, p<0,05). Тромбоциты реагировали сильнее на коллаген у носителей гетерозиготного аллеля (средний радиус образующихся при индукции коллагеном агрегатов из тромбоцитов у 807С-гомозигот, 807СТ-гетерозигот и 807Т-гомозигот соответственно 6,6±3,7, 8,1±3,9, 6,5±2,2 отн.ед., скорость их образования - 18,4±11,9, 26,3±7,9, 19,2±6,0 отн.ед./мин.; U-тест, p<0,05).

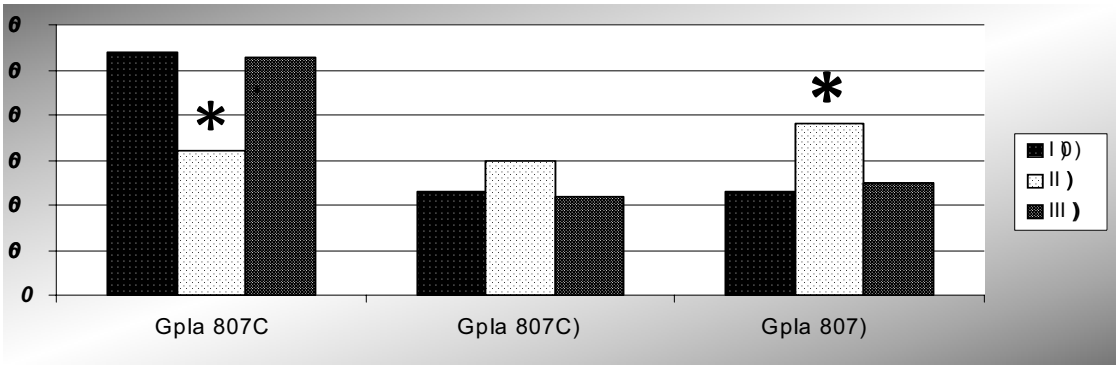

Рис.1. Частота встречаемости полиморфных вариантов гена GpIa (C807-T) у здоровых лиц с разными группами крови АВ0, % ($\square^2$ - тест, * - p<0,05), n=200.

Таблица 3

Функция лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии у здоровых лиц носителей полиморфных вариантов гена GpIa (C807-T) (M±SD)

	GpIa (807C)	GpIa (807CT)	GpIa (807T)
ЛТА, %	14,3±4,4	14,6±2,1	14,3±3,9
ЛТИ, отн.ед.	4,1±1,0	3,6±0,7	2,6±1,1 p<0,05

Примечание: U-тест, p - статистическая значимость различий по сравнению с группой носителей нормального гомо-зиготного 807C варианта.

Сочетание мутантных аллелей генов GpIa 807CT, 807T и GpIIIa 33LeuPro, 33Leu приводит к увеличению размера спонтанно образующихся агрегатов из тромбоцитов (табл. 4).

Таблица 4

Максимальное значение (отн.ед.) и максимальный наклон (отн.ед./мин.) кривых агрегации тромбоцитов у здоровых лиц носителей сочетания мутантных аллелей генов GpIa (C807-T) и GpIIIa (Leu33-Pro) (M±SD)

		GpIa 807CT, 807T + GpIIIa 33LeuPro, 33Leu	Без сочетания мутаций
Спонтанная	Макс.-знач.	1,9±0,3 p<0,05	1,1±0,4
	Макс.-накл.	0,3±0,1	0,4±0,1

Примечание: U-тест, p - статистическая значимость различий по сравнению с груп-пой лиц, не имеющих сочетанных мутаций.

Выводы.

1. Протромботические мутантные аллели генов GpIa (C807-T) и GpIIIa (Leu33-Pro), а также их сочетание чаще выявляются у здоровых людей со II (A) группой крови, способствуя усилению агрегационной функции тромбоцитов.
2. Здоровые лица обладатели "ненулевых" групп крови характеризуются усилением агрегационного потенциала кровяных пластинок на фоне снижения их способности к формированию гетеротипических межклеточных контактов с лимфоцитами.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Витковский, Ю.А. Влияние интерлейкина-1 на способность лимфоцитов выделять факторы, влияющие на адгезию и агрегацию тромбоцитов, свертывание крови и фибринолиз / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2002. - Т. 88. - № 4. - С. 468-475.
2. Витковский, Ю.А. Феномен лимфоцитарно-тромбоцитарного розеткообразования / Ю.А. Витковский, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Иммунология. - 1999. - № 4. - С.35 - 37.
3. Витковский, Ю.А. Цитокины в регуляции системы гемостаза: автореф. дисс. … докт. мед. наук / Ю.А. Витковский. - Чита. - 1997. -32 с.
4. Емельянова, А.Н. Лимфоцитарно-тромбоцитарная адгезия и содержание провоспалительных цитокинов у больных с булёзно-геморрагической формой рожи / А.Н. Емельянова, Ю.А. Витковский // Дальневосточный медицинский журнал. - 2009. - № 2. - С.23-25.
5. Жибурт, Е.Б. Трансфузиология / Е.Б. Жибурт. - Москва- Санкт-Петербург: Питер. - 2002.
6. Зависимость коагулограммы от групповой принадлежности крови // Физиология и пато-логия системы гемостаза / Г.Я. Моржуева [и др.]. - Чита. - 1980. - С.105-106.
7. Кузник, Б.И. Общая гематология и гематология детского возраста / Б.И. Кузник, О.Г Максимова. - М: Феникс. - 2007. - 573с.
8. Кузник, Б.И. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма / Б.И. Кузник, Н.Н. Цыбиков, Ю.А. Витковский // Тромбоз, гемостаз и реология. - 2005. - № 2. - С. 3-16.
9. Кузник, Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник. - Чита: "Экспресс-издательство". - 2010. - 826 с.

10. Симбирцев, А.С. Роль цитокинов в регуляции физиологических функций иммунной системы / А.С. Симбирцев // Физиология и патология иммунной системы. - 2004. - № 10. - С. 3-9.
11. Солпов, А.В. Механизмы лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии: автореферат дисс. … канд. мед. наук / А.В. Солпов. - Чита. - 2005. - 24 с.
12. Состояние иммунитета и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при раке гортани / Ю.А. Витковский, Л.В. Ильиных, Б.И. Кузник, А.В. Солпов // Медицинская иммунология. - 2007. - № 6. - С. 653 - 659.
13. Состояние иммунитета, гемостаза, процессов ПОЛ и лимфоцитарно-тромбоцитарной адгезии при диффузном токсическом зобе / Б.И. Кузник [и др.] // Тромбоз, гемостаз, реология. - 2008. - № 2. - С. 27-35.
14. ABO blood groups and risk of venous thromboembolism during pregnancy and the puerperium. A population-based, nested case-control study / T.B. Larsen [et al] // J. Thromb. Haemost. - 2005. - №3. - P. 300-304.
15. Boven, D.J. An influence of ABO blood groop on the rate of proteolysis of von Willebrandt factor by ADAMTS13 / D.J. Boven // J. Thromb. Haemost. - 2003. - №1. - P. 33-40.
16. Carter, A.M. Platelet glycoprotein IIIa PlA polymorphism in young men with myocardial infarction / A.M. Carter, N. Ossei-Gerning, P.J. Grant // Lancet. - 1996. - V. 348. - P. 485-486.
17. Evidence for an expression of blood group A antigen on platelet glycoproteins IV and V / D. Stockelberg [et al] // Transfus Med. - 1996. - Vol. 6. - N 3. - P. 243-248.
18. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy / J.W. Weisel, C. Nagaswami, G. Vilaire, J.S. Bennett // J. Biol. Chem. - 1992. - Vol. 267. - P. 16637-16643.
19. Jenkins, P.V. ABO blood group determines plasma von Willebrand factor levels: a biologic function after all / P.V. Jenkins, J.S. O,Donnell // Transfusion. - 2006. - Vol. 46. - P. 1836-1844.
20. Li, N. Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations / N. Li, Q. Ji, P. Hjmdahl // J. of Thromb. Haemost. - 2006. - N 4. - P. 864-871.
21. Li, N. Platelet-lymphocyte cross-talk / N. Li // J. of Leukocyte Biol. - 2008. - Vol. 83. - P. 342-350.
22. The relationship between ABO groups and subgroups, factor VIII and von Willebrand factor / N.C. Sousa // Haematologica/the hematology journal. - 2007. - № 2(02). - P. 236-239.
23. Weiss, E.J. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis / E.J. Weiss, P.F. Bray, M. Tayback // N. Engl. J. Med. - 1996. - Vol. 334. - P. 1090-1094.