

УДК 612.111.7:616.921.5(053)

Малежик М.С., Карпова Н.И., Малежик Л.П.

**АГРЕГАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ У ДЕТЕЙ ЧАСТО БОЛЕЮЩИХ ОСТРОЙ  
РЕСПИРАТОРНОЙ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ ПРИ ПОЛИМОРФИЗМЕ ГЕНОВ  
TOLL-4 (ASP299GLY) И TOLL-6 (SER249PRO) РЕЦЕПТОРОВ***ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия*

*В статье приведены данные об изменении агрегационной активности тромбоцитов у детей, часто болеющих острой респираторной вирусной инфекцией. Показано, что при полиморфизме Toll-4 (Asp299Gly) рецепторов спонтанная агрегационная активность у больных детей не изменена. АДФ, адреналин и коллаген увеличивают степень и скорость агрегации тромбоцитов при всех полиморфных вариантах гена Toll-4 рецептора и уменьшают агрегационную активность тромбоцитов при полиморфизме Toll-6 рецепторов, особенно у гетерозигот (Ser249Pro) и мутантных гомозигот 249Pro.*

**Ключевые слова:** острая респираторная вирусная инфекция, агрегация тромбоцитов, полиморфизм генов Toll-like рецепторов.

*L.P. Malezhik, N.I. Karpova, M.S. Malezhik***PLATELET AGGREGATION IN CHILDREN WITH ACUTE RECURRENT  
RESPIRATORY VIRAL INFECTION IN POLYMORPHISMS OF GENES OF TOLL-4  
(Asp299Gly) AND TOLL-6 (Ser249Pro) RECEPTORS**

*The data deals with the changes of platelet aggregation activity in children with recurrent ARI. Spontaneous platelet aggregation showed no changes in patients with genetic defects in Toll-4 (Asp299Gly). ADP, adrenalin, collagen increased degree and rate of platelet aggregation in all polymorphic variants of gene Toll-4 receptor, particularly in heterozygotes (Asp299Gly). After additional stimulators (ADP, adrenalin, collagen) platelet aggregation decreased in patients with palindromic ARI in gene polymorphism Toll-6 (Ser249Pro).*

**Key words:** acute respiratory viral infection, platelet aggregation, polymorphism of genes Toll-4 and Toll-6 receptors.

Способность тромбоцитов образовывать агрегаты лежит в основе образования тромбоцитарной пробки, перекрывающей кровоток в мелких сосудах. В норме тромбоциты свободно циркулируют в кровотоке, не контактируя друг с другом. При любой патологии в кровотоке появляются биологически активные вещества, которые, активируя тромбоциты, вызывают экспрессию на поверхности кровяных пластинок рецепторов, лигандами для которых являются фибриноген, коллаген, фибронектин, фактор Виллебранда (vWF) и ряд других соединений [3,5,7]. Тромбоциты при этом адгезируют, образуют тромбоцитарные агрегаты с выделением огромного количества белков, принимающих участие в процессах гемостаза, воспаления, иммунной защите, ангиогенезе и т.д.[2,7].

При вирусной инфекции появляется множество причин для активации тромбоцитов - в первую очередь, нейраминидаза вируса, к которой есть рецепторы на поверхности тромбоцитов [6]. Циркуляция в крови больших количеств тромбоцитарных агрегатов способна вызвать ухудшение её реологических свойств и, соответственно, расстройство микроциркуляции [1]. Однако агрегационная активность тромбоцитов при ОРВИ не изучалась, и тем более неизвестно на сколько она изменяется при генетических дефектах в Toll-рецепторах. С помощью этих рецепторов тромбоциты контактируют с патогенами, активируются и секретируют собственные соединения.

**Цель исследования:** изучить спонтанную и индуцированную агрегацию у детей, часто

болеющих ОРВИ и являющихся носителями полиморфизма генов Toll-4 и Toll-6 рецепторов.

#### **Материалы и методы исследования.**

Забор материала для клинической группы осуществлялся на базе Областной детской инфекционной больницы в первые трое суток от момента госпитализации (период начальных проявлений заболевания). Обследовано 190 детей обоего пола от 1 до 3-х лет, часто болеющих острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ). Из числа обследуемых детей методом ПЦР у 49% был диагностирован грипп, в 25% - парагрипп, в 5% - аденовирусная инфекция, в 4% - респираторно-синцитиальный вирус. У остальных детей этиология ОРВИ осталась нерасшифрованной.

Критериями включения в исследование были: число эпизодов заболевания не менее 6 раз в году, первые три дня заболевания вирусной инфекцией, наличие характерной клинической картины (лихорадка, интоксикация, выраженные катаральные явления). В исследования не включали детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями (бронхиальная астма, рецидивирующий бронхит), пороками развития или опухолями дыхательной системы.

Контрольную группу составили сопоставимые по возрасту и полу 25 клинически здоровых детей, у которых количество эпизодов ОРВИ было не более 4-х раз в году.

Выделение ДНК осуществлялось при помощи наборов "ДНК-экспресс кровь" (НПФ "Литех", Россия, Москва). Синтез использованных в работе олигонуклеотидных праймеров выполнен НПФ "Литех", Москва. Выявление мутаций проводилось методом ПЦР с электрофоретической детекцией продуктов амплификации. Из обследованных часто болеющих детей 90 являлись носителями полиморфизма генов T-ll-4(Asp299Gly) рецепторов, 100 больных обладали полиморфизмом Toll-6 (Ser249Pro) рецепторов.

Оценку агрегационной способности тромбоцитов осуществляли турбидиметрическим методом с помощью лазерного анализатора агрегации BIOLA (НПФ "Биола", Москва). Исследовали спонтанную, АДФ, адреналин и коллаген индуцированную агрегацию с использованием соответствующ-

щих реактивов, выпускаемых ООО "Технология-стандарт" (Барнаул).

Полученные данные обработаны методом вариационной статистики для связанных между собой наблюдений с помощью пакета статистических программ Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., США). Перед началом анализа вариационные ряды тестировали на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка W. При нормальном распределении применяли параметрические методы статистики - критерий Стьюдента (t-тест). Изучаемые показатели представлены в виде средних величин со стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ).

#### **Результаты и обсуждение.**

В результате проведенных исследований установлено, что у больных с генетическими дефектами в Toll-4 рецепторах спонтанная агрегация не изменена (табл. 1). При индукции агрегации АДФ отмечено увеличение скорости и степени агрегации в зависимости от наличия или отсутствия генетических дефектов в Toll-4 рецепторах. Размер образованных агрегатов увеличивается у гомозигот Asp299 до  $5,8 \pm 2,3$ , у гомозигот 299Gly до  $7,8 \pm 2,6$ . Следовательно, при аномальных вариантах Toll-4 рецепторов АДФ индуцирует скорость и степень агрегации сильнее, чем у носителей нормальной аллели Asp299. Возможно, у тромбоцитов с генетическими дефектами Toll-4 рецепторах увеличена экспрессия рецепторов к индукторам агрегации, к числу которых относится АДФ.

При индукции адреналином степень агрегации тромбоцитов с мутантными Toll-4 рецепторами максимальна у гетерозигот Asp299Gly ( $8,2 \pm 2$ ). Скорость агрегации у гомозигот 299Asp увеличивается в 2 раза ( $7,2 \pm 4$ ) по сравнению с тромбоцитами здоровых детей ( $3,4 \pm 0,9$ ), в 5 раз у гетерозигот ( $17,6 \pm 5,5$ ) и в 4 раза - у мутантных гомозигот 299Gly. При стимуляции коллагеном тромбоциты больных ОРВИ детей без генетических дефектов в Toll-4 рецепторах (299Asp) увеличивают максимальный радиус агрегатов до  $6,6 \pm 0,9$  (в контроле  $4 \pm 0,9$ ). При аномалии в этих рецепторах степень агрегации становится выше ( $7,8 \pm 2,2$ ;  $7,3 \pm 1,5$ ), чем в группе детей без мутаций в тромбоцитарных рецепторах.

Таблица 1

Максимальный радиус агрегатов (отн. ед) и максимальный наклон (отн. ед в мин.) кривых агрегации тромбоцитов у пациентов носителей полиморфных вариантов Asp299Gly в гене Toll-4 рецепторов (M±SD)

		Контрольная группа (n=25)	299Asp (n=40)	Asp299Gly (n=18)	299Gly (n=32)
спонтанная	Макс. знач.	1,9±0,6	1,9±1,2	1,2±0,2	1,3±0,4
	Макс. накл.	1,3±0,6	1,4±2,5	1,2±0,1	1,6±0,5 p<0,05
АДФ	Макс. знач.	3,5±0,7	5,8±1,3 p<0,05	9,8±1,7 p<0,05 p*<0,05	7,8±1,2 p<0,05 p*<0,05
	Макс. накл.	3,8±0,6	11,3±2,4 p<0,05	25,8±4,3 p<0,05 p*<0,05	24,2±2,4 p<0,05
адреналин	Макс. знач.	3,7±0,8	6,1±1,7 p<0,05	8,2±2 p<0,05 p*<0,05	6,8±3 p<0,05
	Макс. накл.	3,4±0,9	7,2±4 p<0,05	17,6±2,5 p<0,05 p*<0,05	14,5±2,2 p<0,05 p*<0,05
коллаген	Макс. знач.	4±0,9	6,6±0,9 p<0,05	7,8±2,2 p<0,05 p*<0,05	7,3±1,5 p<0,05 p*<0,05
	Макс. накл.	3,9±0,9	14,3±1,5	12,6±2,6 p<0,05	18,3±1,6 p<0,05 p*<0,05

Примечание: p- значимость различий по сравнению с контролем, p\* - значимость различий по сравнению с гомозиготами 299Asp.

Полиморфные варианты гена Toll-4 отличаются и по скорости индуцированной агрегации. Коллаген увеличивает скорость агрегации в крови здоровых детей с  $1,3 \pm 0,6$  до  $3,9 \pm 0,9$ . Тромбоциты больных детей агрегируют значительно быстрее. В группе детей-носителей нормальной аллели Asp/Asp агрегация увеличивается с  $1,49 \pm 2,5$  до  $14,3 \pm 7,5$ ; у гетерозигот Asp299Gly до  $12,6 \pm 2,6$ ; у гомозигот 299Gly до  $18,3 \pm 5,6$ .

Тромбоциты с аномальными Toll-6 рецепторами (таблица 2) отвечают на индукцию АДФ уменьшением скорости агрегации. Особенно низка скорость агрегации у гомозигот 249Pro ( $7,1 \pm 6$ ). При этом максимальный размер образованных агрегатов уменьшался у гетерозигот Ser249Pro ( $6,4 \pm 1,2$ ) и гомозигот 249Pro ( $7,6 \pm 2,7$ ), по сравнению с гомозиготами 249Ser ( $9,7 \pm 1,9$ ).

При индукции адреналином и коллагеном тромбоциты с полиморфизмом гена Toll-6 рецептора отвечают снижением скорости и степени агрегации.

Резюмируя изложенные данные, следует отметить, что генетические дефекты в

Toll-4 и Toll-6 рецепторах по-разному отражаются на индуцированной агрегации. При мутациях в гене, кодирующим Toll-4 рецепторы, индукция АДФ, адреналином и коллагеном увеличивает способность тромбоцитов к агрегации. При генетических изъянах в Toll-6 рецепторах индукция теми же агонистами уменьшает агрегационные свойства кровяных пластинок.

Мы считаем, что эффекты индуцированной агрегации связаны с количеством экспрессированных к ним рецепторов и путей трансмембранной сигнализации. Согласно данным литературы [4], различные сигнальные рецепторы имеют свои пути внутриклеточной активации, которые опосредуются через последовательное подключение адапторных белков, протеинкиназ и транскрипционных факторов [8,9,10]. В итоге экспрессируется разное количество генов, кодирующих рецепторы к различным биологически активным веществам. Если это так, то реакция генетически аномальных Toll-4 рецепторов сопровождается увеличением экспрессии рецепторов к АДФ, адреналину, коллагену.

Таблица 2

Максимальный радиус агрегатов (отн. ед) и максимальный наклон (отн. ед в мин.) кривых агрегации тромбоцитов у пациентов носителей полиморфных вариантов Ser249Pro в гене Toll-6 рецепторов (M±SD)

		Контрольная группа (n=25)	249Ser (n=25)	Ser249Pro (n=50)	249Pro (n=25)
спонтанная	Макс. знач.	1,9±0,6	1,4±0,4	1,3±0,5	1,3±0,1
	Макс. накл.	1,1±1,1	1,3±0,2 p<0,05	1,4±0,1 p<0,05	1,5±0,4
АДФ	Макс. знач.	3,5±0,7	9,7±1,9 p<0,05	6,4±1,2 p<0,05 p*<0,05	7,6±2,7 p<0,05
	Макс. накл.	3,8±0,6	30,2±3,3 p<0,05	16,2±1,8 p<0,05 p*<0,05	7,1±6 p<0,05 p*<0,05
адреналин	Макс. знач.	3,7±0,8	6,9±1,5 p<0,05	5,3±1,3 p<0,05 p*<0,05	4,9±1,6 p<0,05 p*<0,05
	Макс. накл.	3,4±0,9	12,3±2,8 p<0,05	7,4±1,7 p<0,05 p*<0,05	4,3±1,2 p<0,05 p*<0,05
коллаген	Макс. знач.	4±0,9	8,2±1,4 p<0,05	6,4±0,8 p<0,05 p*<0,05	7,5±1,5 p<0,05 p*<0,05
	Макс. накл.	3,9±0,9	22,9±2,3 p<0,05	17,3±2 p<0,05 p*<0,05	9,9±1,3 p<0,05 p*<0,05

Примечание: см. таблицу 1

Реакция мутантных Toll-6 рецепторов, напротив, уменьшает число экспрессированных рецепторов к изучаемым индукторам агрегации.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бельченко Д.И. Активация межклеточных взаимодействий в циркулирующей крови и микроциркуляции / Д.И. Бельченко, А.В. Есипова, Е.А. Кривошеина // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2005. - Т. №2. - С. 53-57.
2. Бурячковская Л.И. Гетерогенность тромбоцитов человека и животных. Связь морфологических особенностей с функциональным состоянием. Автореф. дис. ... доктора биол. наук: Москва. - 2007. - 46с.
3. Динамика морфологических структур тромбоцитов у больных ишемической болезнью сердца в зависимости от уровня жирных кислот в крови / Е.И. Соколов [и др.] // Кардиология. - 2011. - №1. - С. 29-33.
4. Козлов И.Г. Сигнальные рецепторы врожденного иммунитета / И.Г. Козлов // Вестник Российской АМН. - 2011. - №1. - С. 42-50.
5. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И. Кузник, Чита: Экспресс-издательство, 2010. - 832с.
6. Общие сведения о системе комплемента / В.А. Алёшкин [и др.] // Учебное пособие по иммунологии. - Москва, 2003. - 185с.
7. Шитикова А.С. Тромбоцитопатии врожденные и приобретенные / А.С. Шитикова. - СПб, 2008. - 384с.
8. Andonegui G. Platelets express functional Toll-like receptor-4 / G. Andonegui, S.M. Kenfoot / Blood. - 2005. - V.106. - P. 21417-23.
9. Caamano G. NF-kb family of transcription factor central regulators of innate and adaptive immune function / G. Caamano, C.A. Hunger // Clin. Microbiol. Rev. - 2002. - V.15(3). - P. 414-429.
10. Role of adapter TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway / U. Yamamoto [et al.] // Science. - 2003. - V.301. - P. 640-643.