

МЕМБРАННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ ТРОМБОЦИТОВ: ФУНКЦИИ И ПОЛИМОРФИЗМ

Е.Н. Воронина¹, М.Л. Филипенко¹, Д.С. Сергеевичев¹, И.В. Пикалов²

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: max@niboch.nsc.ru;

² Новосибирская государственная медицинская академия,
кафедра клинической лабораторной диагностики, Новосибирск, Россия

Изучение молекулярно-биологических аспектов функционирования как клетки, так и систем организма человека привело к открытию новых ингибиторов каскада свертывания, нового семейства рецепторов, активируемых факторами свертывания крови, новых функций известных адгезивных белков и развитию новых представлений о механизмах гемостаза и тромбообразования. В данном сообщении кратко описывается роль мембранных рецепторов тромбоцитов в процессе образования тромба, рассматриваются полиморфные варианты их генов и их возможная роль в патологиях, связанных с нарушением агрегации тромбоцитов.

Молекулярные механизмы адгезии и агрегации тромбоцитов при тромбообразовании

В соответствии с имеющимися представлениями тромбоциты циркулируют в крови в относительно неактивном состоянии и не взаимодействуют с интактным эндотелием, выстилающим кровеносные сосуды. Повреждение стенки сосуда запускает каскад процессов, ведущих к образованию тромба из тромбоцитов и фибрина, для остановки кровотечения из поврежденного сосуда (рис. 1). Процесс агрегации тромбоцитов и образования тромба сложен и может быть разбит на три стадии.

Узнавание поврежденной стенки кровеносного сосуда. Первой стадией свертывания крови является «случайное» прилипание тромбоцитов к субэндотелиальному матриксу или активированному эндотелию. Данный процесс инициируется при повреждении стенки сосуда и дисфункциях эндотелия, вызываемых острой гипертензией, продуктами курения, свободными радикалами, бактериальными токсинами, вирусной инфекцией, цитокинами (TNF, IL-1 и др.), окисленными липопротеинами, иммунными комплексами и др. (Струкова, 2002). При этом из эндотелиальных клеток в кровь

и экстраклеточный матрикс высвобождается содержимое телец Вейбла-Палада, которые представляют собой мультимеры фактора фон Виллибранда (ФВ) и Р-селектина (Schmugge *et al.*, 2003).

ФВ имеет две основные функции. Первая – связывание и стабилизация VIII фактора *in vivo* и *in vitro* (защита VIII фактора от инактивации протеином С и Ха-фактором). Вторая – обеспечение связей между тромбоцитами и сосудистой стенкой (адгезия тромбоцитов) и тромбоцитами (агрегация тромбоцитов) (Meug, Girma, 1993). Р-селектин обеспечивает агрегацию лейкоцитов к месту повреждения кровеносного сосуда.

Первичное прилипание требует специфического связывания ФВ и мембранного комплекса гликопротеинов тромбоцитов GPIb/IX/V. ФВ служит мостиком между коллагеном и тромбоцитами и является необходимым для адгезии тромбоцитов к коллагену при высокой скорости тока крови (Fitzgerald, Philips, 1987). Данная связь является достаточно слабой, однако приводит к замедлению движения тромбоцита через тромбогенную коллаген-богатую поверхность, что делает возможным взаимодействие других рецепторов тромбоцитов с коллагеном. Эта связь является критичной для нормального функционирования тромбоцитов при прекра-

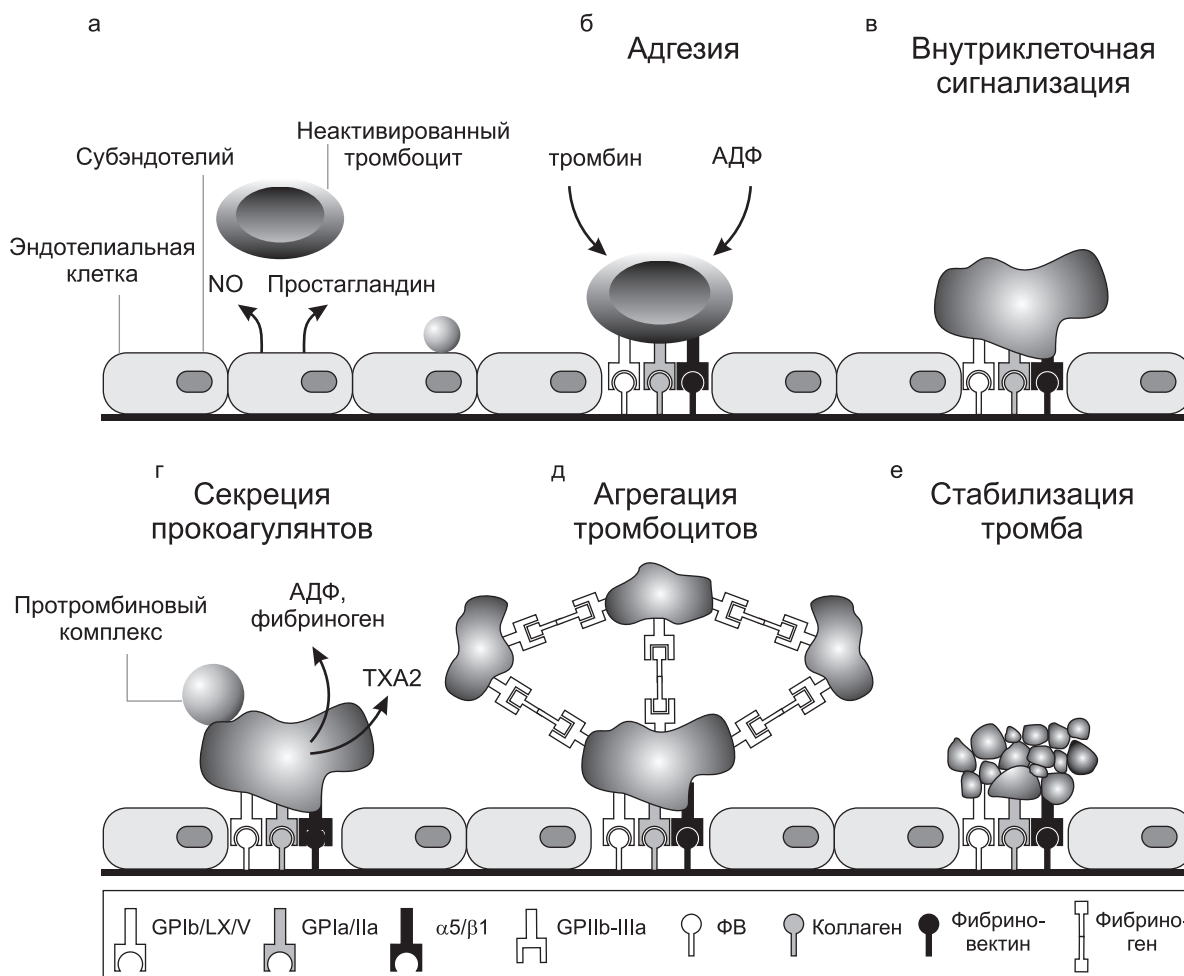


Рис. 1. Схема формирования тромба при повреждении стенки кровеносного сосуда (Bhatt, Topol, 2003).

щении кровотечения, а также является важным шагом при адгезии тромбоцитов к экспонированным тромбогенным материалам при повреждении атеросклеротической бляшки.

Адгезия тромбоцитов. На второй стадии тромбоциты формируют более стабильный монослой над тромбогенной поверхностью. Данный процесс обеспечивается различными рецепторами в зависимости от природы экстраклеточного матрикса и присутствующих адгезивных молекул. В области повреждения кровеносных сосудов обычно присутствует большой избыток коллагена, и в действие в первую очередь вступают коллагенные рецепторы, такие, как GPIIb/IIIa (другое название – интегрин α_2/β_1) и GPVI. Комплекс GPIIb/IIIa главным образом поддерживает связь тромбоцита с коллагеном, в то время как рецептор GPVI проводит сигнал через мембрану внутрь

клетки для дальнейшей активации тромбоцита. Данный сигнал служит началом третьей стадии процесса тромбообразования.

Агрегация тромбоцитов. Третьей стадией является агрегация тромбоцитов, в процессе которой множество тромбоцитов связываются между собой с помощью фибриногена или ФВ через активированные рецепторы тромбоцитов GPIIb-IIIa. Эта стадия является общей для большинства путей активации тромбоцитов. Таким образом, независимо от пускового сигнала процесс агрегации заканчивается конформационным изменением, испытываемым комплексом поверхностного гликопротеина GPIIb-IIIa, который преобразует его в рецептор для фибриногена. После связывания с этим рецептором фибриноген действует как мостик между прилегающими тромбоцитами. Управляемая тромбином трансформация фибриногена в

фибрин стабилизирует этот агрегат тромбоцитов и формирует тромб.

Активация тромбоцитов через рецепторы GPIb/IX/V и GPVI также приводит к запуску так называемого арахидонового каскада, вследствие чего образуется тромбоксан A₂, который в свою очередь ведет к высвобождению содержимого запасящих α-гранул тромбоцитов и дополнительной секреции ФВ, Р-селектина и других активных веществ (АДФ, тромбин, тромбоксан A₂, фактор активации тромбоцитов, серотонин, норадреналин) (Lefkovits *et al.*, 1995). АДФ, тромбин и другие соединения в свою очередь через рецепторы, связанные с G-белком, дополнительно активируют GPIb-IIIa-зависимую агрегацию тромбоцитов. Р-селектин также может связываться с тромбоцитарным рецептором GPIb/IX/V и лейкоцитарным рецептором PSGL-1, что, например, способствует привлечению провоспалительных лейкоцитов в места атеросклеротических бляшек.

Конгломерат тромбоцитов постоянно увеличивается за счет выброса новых порций АДФ из вовлекаемых в процесс интактных тромбоцитов. Этот процесс мог бы продолжать распространяться по кровотоку, если бы не был ограничен простагландином ПГИ₂. В ответ на выделение из агрегирующих тромбоцитов АДФ и тромбоцитарного фактора 3, стимулирующего «внутренний путь» образования тромбина, в неповрежденных эндотелиоцитах включается арахидоновый каскад, в результате действия которого образуется простагландин ПГИ₂, который препятствует дальнейшей агрегации тромбоцитов, чем и ограничивает размер агрегата тромбоцитов пределами поврежденного участка сосуда.

Структура мембранных рецепторов тромбоцитов

Рецепторы тромбоцитов представляют собой гликопротеины мембраны, большинство из которых относятся к семейству так называемых интегринов – семейству рецепторов, имеющих близкую структуру и ответственных за взаимодействия между клетками, а также между клетками и белками (Hynes, 1987; Smyth *et al.*, 1993). Интегрины находятся на поверхностях практически всех типов клеток, они участву-

ют во многих физиологических процессах. Большинство рецепторных белков относятся к группе интегринов.

С использованием иммунохимических методов на поверхности тромбоцитов было обнаружено несколько гликопротеинов, часть из которых специфична только для тромбоцитов. За процесс адгезии тромбоцитов ответственны несколько рецепторов мембраны тромбоцитов, среди которых есть представители семейства интегринов и неинтегринов. В частности, к семейству интегринов относится комплекс GPIa/IIa, связывающийся с коллагеном.

Комплекс GPIb/IX/V. Гликопротеиновый комплекс GPIb/IX/V является продуктом четырех генов. Ген *GPIba*, локализованный на коротком плече хромосомы 17, кодирует полипептид с массой 143 кД. Ген *GPIbβ*, расположенный на длинном плече хромосомы 22, кодирует полипептид меньшего размера – 22 кД. Гены, кодирующие GPIX и GPV, находятся на хромосоме 3 и кодируют полипептиды с массой 20 и 83 кД соответственно. Полипептиды GPIbβ и GPIba ковалентно связаны дисульфидной связью. Комплекс GPIb/IX/V является гептамером, состоящим из одной молекулы GPV и нековалентно ассоциированными с ней двумя молекулами GPIb и двумя молекулами GPIX (рис. 1). Основной характерной чертой всех субъединиц данного комплекса является наличие лейцин-богатых повторов (Modderman *et al.*, 1992).

Комплекс GPIb/IX/V является основным тромбоцитарным рецептором для ФВ, а его плотность составляет около 25 тысяч молекул на тромбоцит. Данный рецептор обеспечивает прикрепление тромбоцитов к субэндотелию за счет взаимодействия ФВ с N-концевым доменом (1-282) GPIba (рис. 2) (Ruggeri *et al.*, 1992). Также в этом районе расположены частично перекрывающиеся, но не идентичные сайты связывания лейкоцитарного интегрин αMβ₂, α-тромбина и Р-селектина, экспрессирующихся на активированных эндотелиальных клетках.

К настоящему времени описаны полиморфные варианты гена в двух локусах, имеющие разные аминокислотные последовательности в «тяжелой» цепи комплекса (GPIba). Замена С на Т в положении 3550 гена *GPIba* приводит к замене треонина на метионин в позиции 145

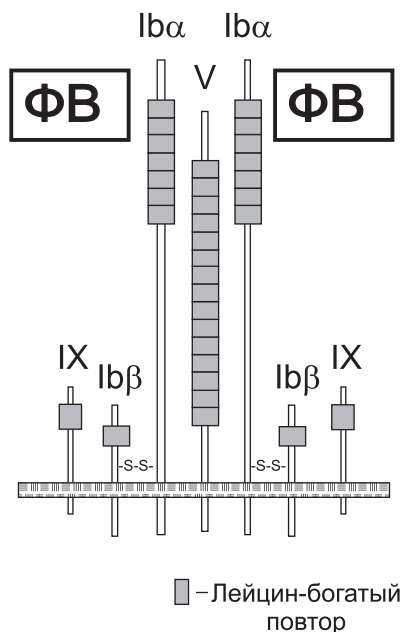


Рис. 2. Схема гликопротеинового комплекса GPIb/IX/V (Bussel *et al.*, 2000).

(Thr145Met) (Kuijpers *et al.*, 1992). Следует заметить, что диморфизм треонин/метионин обуславливает и антигенные различия тромбоцитов по системе HPA-2a/2b (табл. 1). Замена Thr145Met приводит к конформационным изменениям в области, примыкающей к месту связывания фактора фон Виллебранда с GPIba, хотя *in vitro* до настоящего времени каких-либо изменений в связывании лиганда с рецептором не было обнаружено.

Другим полиморфным локусом является tandemный повтор размером 39 п.н., кодирующий 13 аминокислот в гликопептидной части молекулы GPIba (Mogoi *et al.*, 1984). В европейской популяции обнаружено 4 аллеля данного VNTR-повтора: изоформа *D* содержит один повтор, изоформа *C* – 2 повтора, *B* – 3 повтора и *A* – 4 повтора. Данный повтор богат пролином, серином и треонином, которые являются потенциальными сайтами гликозилирования. Каждая единица добавляет 3,2 нм к длине внеклеточного домена (Lopez *et al.*, 1992), что может приводить к увеличению доступности сайта связывания ФВ и тромбина. Известно 5 гаплотипов вышеописанных полиморфных локусов гена *GPIba*, причем более длинные аллели *A* и *B* сцеплены с аллелем *145Met* (табл. 1).

Исследование частот встречаемости аллелей

и генотипов *VNTR*-локуса гена *GPIba* в исследуемой популяции г. Новосибирска показало увеличение частоты встречаемости аллеля *D* и снижение частоты встречаемости аллеля *B* по сравнению с европейскими популяциями (табл. 2). Наиболее близкое распределение частот встречаемости аллелей наблюдается у белых жителей США, что может отражать смешение генофондов разных рас, активно происходящее как в США, так и в Новосибирской области.

Также обнаружен еще один полиморфный локус гена *GPIba*, расположенный в 5'-нетранслируемой области – замена Т на С в положении -5 (от AUG-кодона) (Afshar-Khargan *et al.*, 1998). Данная замена приводит к нарушению регуляторной последовательности (элемент Козак), что оказывает влияние на эффективность трансляции. Наличие аллеля *C* увеличивает количество комплекса GPIb, обнаруживаемое на мембранах тромбоцитов (относительный уровень: *T/T* = 1,0, *C/T* = 1,3, *C/C* = 1,5).

Функциональная оценка влияния полиморфных вариантов гена *GPIba* на скорость тромбообразования проводилась только в нескольких

Таблица 1
Аллели мембранных гликопротеинов тромбоцитов

Ген	Аллели	Частота встречаемости*	HPA-антигены
<i>GPIba</i>	<i>145Thr-VNTR C</i>	0,82	2a
	<i>145Thr-VNTR D</i>	0,11	2a
	<i>145Met-VNTR B</i>	0,07	2b
	<i>145Met-VNTR C</i>	<0,01	2b
	<i>145Met-VNTR A</i>	<0,01	2b
	<i>-5T</i>	0,85	
	<i>-5C</i>	0,15	
<i>GPIIb</i>	<i>837Val-843Ile</i>	0,61	3a
	<i>837Val-843Ser</i>	0,36	3b
	<i>837Met-843Ser</i>	0,03	3b
<i>GPIIIa</i>	<i>33Leu</i>	0,85	1a
	<i>33Pro</i>	0,15	1b
<i>GPIa</i>	<i>Lys505-807C</i>	0,09	5a
	<i>505Glu-807C</i>	0,52	5b
	<i>505Glu-807T</i>	0,39	5b

* Частоты встречаемости приведены для европеоидной популяции.

Таблица 2

Частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного *VNTR*-локуса гена *GPIIb* в различных популяциях

Популяция	Частоты встречаемости									
	Аллели				Генотипы					
	A	B	C	D	B/B	B/C	B/D	C/C	C/D	D/D
Польша	0	0,22	0,73	0,04						
Германия	0	0,1	0,82	0,08	0,01	0,19	0,02	0,67	0,1	0,005
США (белые)	0,01	0,07	0,82	0,11						
Новосибирск	0	0,01	0,86	0,13	0	0,01	0	0,78	0,16	0,05

небольших исследованиях и показала, в частности, что аллели C и D *VNTR*-локуса и -5C связаны с увеличением скорости формирования тромбов при повышении скорости тока крови (Jilma-Stohlawetz *et al.*, 2003). Существуют и другие данные о связи аллеля -5C с увеличением скорости формирования тромбов при нормальной скорости тока крови и отсутствии такой ассоциации при ее увеличении (Cadroy *et al.*, 2001). Однако стоит учесть, что это исследование проводилось на выборке из 40 человек.

«Легкая» цепь комплекса Ib (*GPIIb*) представлена двумя аллельными вариантами. Замена Gly15Glu формирует два антигенных варианта тромбоцитов по системе HPA-11aw/11bw (табл. 1). Однако частота встречаемости аллеля 15Glu в европейской популяции очень низка – менее 1 % (Kiefel *et al.*, 1995).

Комплекс GPIa/IIa. Комплекс GPIa/IIa (другое название – интегрин α_2/β_1) играет основную роль при адгезии тромбоцитов как к фибриллярному (тип I или III), так и к нефибриллярному (тип II или IV) коллагену (рис. 3). GPIa является α_2 -цепью с массой 165 кД, а GPIIa – β_1 – цепью с массой 145 кД. Плотность этого рецептора на внешней мембране тромбоцитов по сравнению с другими низка и составляет от 800 до 3000 молекул на тромбоцит. Однако даже в норме количество гетеродимера на мембране тромбоцитов может сильно варьировать, что коррелирует со способностью тромбоцитов связываться с коллагеном (Kunicki *et al.*, 1993).

Выявлено несколько полиморфных вариантов этого комплекса, обусловленных вариативностью гена *GPIa* (в том числе и антигенный полиморфизм HPA5a/5b – A1648G (Lys505Glu)).

Нуклеотидная замена С на Т в позиции 807, не приводящая к замене аминокислоты, влияет на количество экспрессируемого GPIa. Оказалось, что 807T вариант гена *GPIa* ассоциирован с повышением плотности рецептора на тромбоците и увеличением индуцируемой коллагеном агрегации тромбоцитов. Механизм этой ассоциации остается пока неясным. Возможно, что аллель 807T находится в неравновесном сцеплении с другими функциональными полиморфизмами в гене *GPIa*. Следует отметить, что HPA-5b-вариант может соответствовать как аллелю 807C (низкая плотность GPIa – гаплотип 505Glu-807T), так и аллелю 807T (высокая плотность GPIa – гаплотип 505Glu-807C), в то время как наличие HPA-5a однозначно определяет низкую плотность рецепторного комплекса GPIa/IIa (гаплотип Lys505-807C) (Kritzik *et al.*, 1998).

В промоторной области гена *GPIa* также обнаружены полиморфные локусы С-52Т и С-92G. Присутствие аллеля -52Т (частота встречаемости 0,35) или -92G (частота встречаемости 0,15) приводит к уменьшению плотности комплекса GPIa/IIa на мембране тромбоцитов.

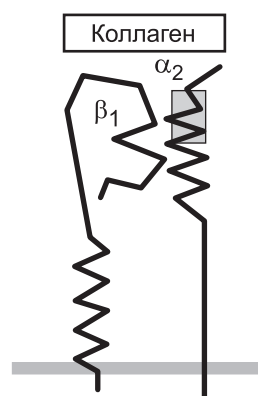


Рис. 3. Схема гликопротеинового комплекса GPIa/IIa (Bussel *et al.*, 2000).

Данные замены оказывают независимое отрицательное влияние на транскрипцию гена и, как было показано в опытах по трансфекции мегакариоцитов, имеют кумулятивный эффект. Таким образом, наличие значительной вариабельности плотности GPIa/IIa-рецептора на мембранах тромбоцитов у нормальных людей можно объяснить суммарным эффектом всех полиморфных вариантов, а также влиянием дополнительных несцепленных генетических факторов (Jacquelin *et al.*, 2001).

Гликопротеин GPVI. Гликопротеин GPVI является мембранным рецептором тромбоцитов к коллагену, который распознает аминокислотную последовательность глицил-пролил-оксипролил (Gly-Pro-Hyp) (Knight *et al.*, 1999). При взаимодействии лиганда с GPVI происходит активация тромбоцитов через механизм, подобный проведению сигнала через рецепторы иммуноглобулинов. Так, связанный с лигандом GPVI образует комплекс GPVI-Fc γ , что приводит к фосфорилированию FcR γ и далее к активации PLC γ 2 и высвобождению содержимого гранул и агрегации тромбоцитов (Andrews, Berndt, 2004).

Гликопротеин GPVI состоит из 319 аминокислот, из которых 19 аминокислот относятся к трансмембранному домену. GPVI принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов, его последовательность имеет высокий процент гомологии с Fc α R и рецепторами NK-клеток. Однако цитоплазматический домен, состоящий из 51 аминокислоты, имеет нехарактерное для данного семейства строение (Jandrot-Perrus *et al.*, 2000).

В нормальной популяции обнаружена значительная гетерогенность как по плотности гликопротеина GPVI на мембране тромбоцитов, так и по его способности связывать лиганд. Эти данные позволяют предположить наличие полиморфных вариантов гена, влияющих на экспрессию и строение данного рецептора, однако до сих пор таких нуклеотидных замен не обнаружено (Furihata *et al.*, 2002).

Комплекс GPIIb/IIIa. Гетеродимер GPIIb/IIIa (другое название – интегрин α_{IIb}/β_3) является поверхностным рецептором тромбоцитов, который активируется в результате передачи сигнала от рецепторов адгезии GPVI и GPIb/IX/V, рецепторов, связанных с G-белком (на-

пример, рецепторы тромбина PAR-1 и PAR-4), и рецепторов АДФ (P2Y₁ и P2Y₁₂). В процессе Ca²⁺-зависимой активации комплекс претерпевает ряд конформационных изменений, которые обеспечивают возможность связывания тромбоцита с фибриногеном.

Механизм функционирования IIb/IIIa-рецептора заключается в его способности узнавать две характерные аминокислотные последовательности. Первая состоит из аминокислот Арг-Гли-Асп, она обнаружена в фибронектине, факторе Виллебранда, витронектине, а также и в α -цепях молекул фибриногена, причем на каждую половину молекулы фибриногена приходится по две ключевых последовательности Арг-Гли-Асп (Pierschbacher, Ruoslahti, 1984). Следует подчеркнуть, что «ключевая» последовательность Арг-Гли-Асп узнаваема большинством представителей семейства интегринов. Детальные механизмы взаимодействия IIb/IIIa рецепторов с адгезивными молекулами до конца не изучены, но очевидно, что пептиды или мелкие молекулы, содержащие ключевую последовательность аминокислот Арг-Гли-Асп, могут являться потенциальными ингибиторами взаимодействия IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов с фибриногеном.

Вторая последовательность аминокислот, узнаваемая IIb/IIIa рецепторами тромбоцитов, представляет собой Лиз-Глн-Ала-Гли-Асп-Вал, она находится в карбоксильном конце γ -цепей фибриногена. В отличие от Арг-Гли-Асп, последовательность Лиз-Глн-Ала-Гли-Асп-Вал обнаружили только в молекуле фибриногена, и, вероятно, именно в этом месте фибриноген связывается с IIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов (Farrell *et al.*, 1992; Weisel *et al.*, 1992).

GPIIb состоит из находящейся на поверхности тромбоцита тяжелой цепи с массой 116 кД, ковалентно связанной одной дисульфидной связью с легкой (22 кД) цепью, которая является трансмембранным белком. GPIIa-субъединица – гликозилированный полипептид с массой 90 кД, который состоит из трех доменов – большого внеклеточного региона на N-конце, трансмембранного домена и короткого цитоплазматического сегмента на C-конце (рис. 4). Гены, кодирующие GPIIb/IIIa, локализованы на длинном плече хромосомы 17 внутри сегмента размером 260 т.п.н.

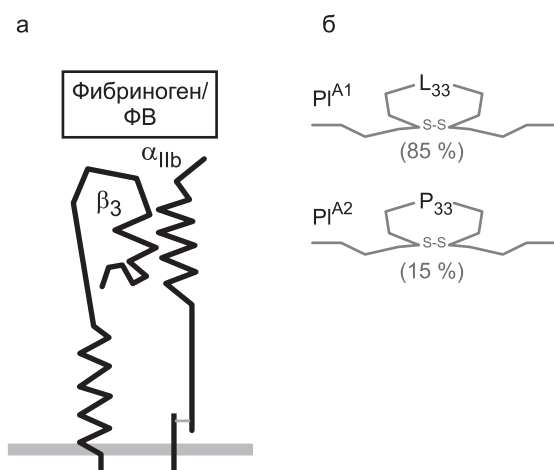


Рис. 4. Схема гликопротеинового комплекса GPIIb/IIIa (а). Аллельные варианты белка GPIIb (Bussel *et al.*, 2000) (б).

На одном тромбоците обнаруживается от 50 до 80 тыс. молекул этого комплекса. Врожденная недостаточность гликопротеина IIb или IIIa (известно около 18 мутаций) сопровождается нарушением всех видов агрегации тромбоцитов, что наблюдается при тромбастении Гланцмана (Lane, Grant, 2000).

К настоящему времени описан ряд мутаций, приводящих к полиморфизму гетеродимера GPIIb/IIIa. Для *GPIIb* известно 2 полиморфных локуса: Val837Met и Ile843Ser, сочетания которых образуют 3 гаплотипа (табл. 1). Замена Ile843Ser расположена недалеко от центра связывания лиганда рецепторным комплексом GP IIb/IIIa, что, соответственно, может влиять на активность рецептора. Однако экспериментальных данных на этот счет пока еще нет.

Ген *GPIIIa* встречается в европейской популяции в 8 вариантах, которые различаются в 6 позициях аминокислотной последовательности (Newman *et al.*, 1989; Lyman *et al.*, 1990; Noris *et al.*, 1995). 5 аминокислотных замен являются очень редкими, наибольший интерес представляет только точечная мутация, приводящая к замене лейцина на пролин в 33-м положении белка GPIIIa. Данная замена приводит к конформационному изменению N-терминальной дисульфидной петли GPIIIa, относящейся к сайту связывания фибриногена. Замещение лейцина пролином обусловлено заменой Т на С в экзоне 2 гена *GPIIIa* в положении 1565.

Аллель *Leu33* является более распространенным в европейской популяции, тогда как аллель *Pro33* встречается с частотой 10–15 % (Newman, 1997). В африканской популяции частота встречаемости данного аллеля снижается до 5–8 % и, наконец, он практически отсутствует в азиатской популяции. В современной литературе используют две номенклатуры для их обозначения. Согласно более старой (но, тем не менее, используемой и в настоящее время), аллель *Leu33* (*1565T*) обозначают *PLA1*, а аллель *Pro33* (*1565C*) – *PLA2*. Когда выяснили, что эта же нуклеотидная замена обуславливает и иммунологическую вариабельность одного из тромбоцитарных антигенов, а именно HPA-1, было предложено обозначать аллель *PLA1* как *HPA-1a*, а *PLA2* – как *HPA-1b* (табл. 1).

Эксперименты *in vitro* не дали ясного ответа на вопрос о функциональной значимости данного полиморфизма. Тромбоциты, несущие GPIIIa с пролином в 33-м положении, имеют более низкий порог активации, а также более чувствительны к действию некоторых анти-тромботических агентов (например, аспирин) (Michelson *et al.*, 2000). Однако другие авторы не обнаружили достоверных отличий в способности связывать лиганды у разных аллелей *GPIIIa* (Bennett *et al.*, 2001). Таким образом, вопрос о связи данного полиморфного локуса с предрасположенностью к развитию тромботических осложнений остается открытым.

Полиморфизм генов гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов и риск развития тромболитических заболеваний

Гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов играют значительную роль в адгезии и агрегации тромбоцитов при образовании тромба, что позволяет рассматривать их как гены-кандидаты для исследований по ассоциации с острым коронарным синдромом и другими заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Ген *GPIIIa*. Основным изучаемым полиморфным локусом гена *GPIIIa* является аминокислотная замена Leu33Pro (аллель *Leu33* (*1565T*) = *PLA1*, аллель *Pro33* (*1565C*) = *PLA2*). Так, согласно результатам (Weiss *et al.*, 1996), относительный риск возникновения инфаркта миокарда (ИМ) у носителей аллеля *Pro33* равен

2,8, а в группе лиц моложе 60 лет он возрастает до 6,2. Затем появилось сообщение, что у олимпийского чемпиона по фигурному катанию, умершего внезапно на тренировке от ишемической болезни сердца (ИБС), найден гомозиготный генотип по аллелю *Pro33* (Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1996). Однако в последующие 2–3 года исследования не выявляли связи данного полиморфного локуса ни с наличием, ни с тяжестью развития острого коронарного синдрома (ОКС) (Herrmann *et al.*, 1997; Marian *et al.*, 1997; Ridker *et al.*, 1997; Samani, Lodwick, 1996; Gardeman *et al.*, 1998). Особенно следует отметить результаты больших исследований US Physicians Health Study (374 человека с ИМ и 704 – контроль) и ЕСТИМ (620 человека с ИМ и 700 – контроль). Разбиение на субгруппы по возрасту также не подтвердило наличие ассоциации аллеля *Pro33* с ИМ (Herrmann *et al.*, 1997; Ridker *et al.*, 1997). Показана значительная ассоциация аллеля *Leu33* с тяжелым коронарным атеросклерозом (Gruchala *et al.*, 2003). В то же время была выявлена ассоциация данного аллеля с ИМ в группе из 200 человек моложе 45 лет (OR = 1,8), которая резко возрастала у курильщиков (OR = 13,7) (Carter *et al.*, 1996).

В четырех больших исследованиях (суммарно 1140 больных и 1612 здоровых) не было выявлено увеличения частоты встречаемости *Pro33*-аллеля среди больных с ишемическим инсультом (Carlsson *et al.*, 1997; Ridker *et al.*, 1997). Однако при выделении субгруппы больных инсультом определенного генеза (Large-Vessel Disease stroke) обнаружили, что относительный риск развития данного заболевания увеличился в 2,5 раза у носителей *Pro33*-аллеля (Slowik *et al.*, 2004). Также было показано, что данный аллель значительно чаще встречается в группе людей, перенесших инсульт в возрасте до 47 лет (Carter *et al.*, 1997).

Таким образом, влияние данного полиморфного локуса на развитие тромботических осложнений выявляется в основном при исследовании определенных субгрупп больных ОКС (курение, молодой возраст). То есть сам по себе аллель *Pro33* вносит незначительный вклад в развитие ОКС.

Ген *GPIIb*. Данные об ассоциации аллелей гена *GPIIb* с ОКС и атеросклерозом касаются только замены Ile843Ser, с которой связана

антигенность тромбоцитов по системе HPA-3. Так, большинство исследований не показало наличие связи какого-либо из аллелей с увеличением риска возникновения инсульта или ИМ (Carlsson *et al.*, 1997; Bottiger *et al.*, 2000). В то же время относительный риск смертности после инсульта оказался выше у носителей аллеля *Ile843* (Carter *et al.*, 1999). Также данный аллель достоверно чаще встречался в группе молодых людей, перенесших ИМ (Park *et al.*, 2004).

Ген *GPIa*. Молчащая нуклеотидная замена С807Т оказывает влияние на число копий комплекса GPIa/IIa на мембране тромбоцита, что предполагает наличие ассоциаций аллелей данного полиморфного локуса с ОКС. В обширном исследовании, охватившем 2237 немецких мужчин, было установлено преобладание *807T*-аллеля у лиц, перенесших ИМ, по сравнению с контрольной группой (OR = 1,57). В группе мужчин моложе 49 лет OR возрастал до 4,92 (Santoso *et al.*, 1999). *807T*-аллель ассоциирует и с 2–3-кратным повышением риска ишемического инсульта у мужчин моложе 50 лет и женщин в возрасте до 45 лет (Moshfegh *et al.*, 1999). Таким образом, эти данные позволяют рассматривать *807T*-аллель как генетический фактор риска ранних артериальных тромбозов. Однако, как и в случае других полиморфных локусов, существуют ряд исследований, в которых не было обнаружено ассоциаций данного аллеля с ИМ или атеросклерозом (Croft *et al.*, 1999; von Beckerath *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2004).

Ген *GPIba*. Наличие трех полиморфных локусов в данном гене, два из которых затрагивают структуру белка (HPA-2 и VNTR), а третий (С-5Т) влияет на его количество на мембране тромбоцитов, делает его наиболее привлекательным в плане изучения генетической ассоциации с ОКС. Всего на данный момент известно 10 гаплотипов гена *GPIba*. В исследовании 101 пациента с ОКС, 104 – с нарушением мозгового кровообращения и 94 – с венозным тромбозом была выявлена ассоциация C/B(VNTR)-генотипа и аллеля *145 Met* с нарушением артериального кровообращения (OR = 2,84) (Gonzalez-Conejero *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 1997). Аллель *-5C* чаще встречается в группе больных ИМ (возраст менее 50 лет), чем в контроле (Afshar-Kharghan *et al.*, 1998). Однако также есть работы, в которых

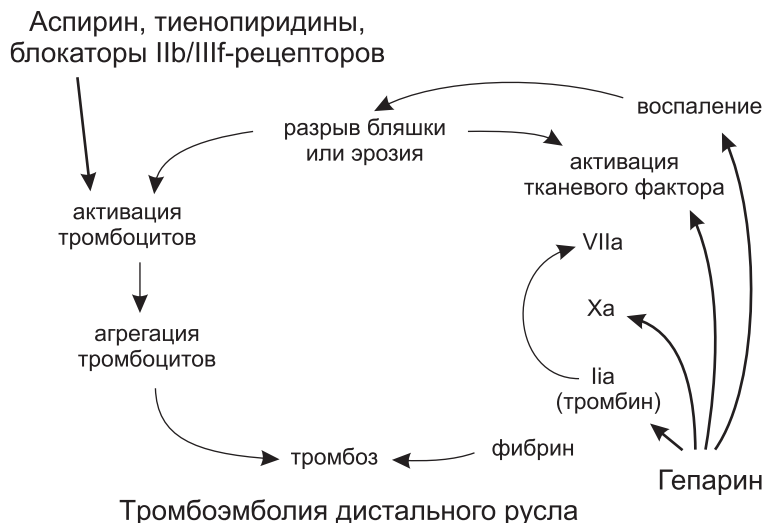


Рис. 5. Патогенез острых коронарных синдромов. Точки приложения антиагрегационных препаратов и гепаринов (Пархоменко, 2002).

не показана связь данных полиморфных локусов с ОКС (Corral *et al.*, 1998; Ishida *et al.*, 2000).

По-видимому, как и для большей части описанных генетических дефектов, риск носительства «протромботического» варианта в значительной степени модифицируется целым рядом иных факторов. В результате при исследованиях различных гетерогенных групп пациентов получают противоречивые результаты. Видимо, в данном случае необходимо изучать ассоциацию не с заболеванием как таковым, а с определенными характеристиками тромбообразования у пациентов. Вероятно, оценка 1–2 полиморфных локусов не имеет ясного клинического значения в патогенезе такого сложного заболевания, как ОКС. Также не исключается отличающаяся роль некоторых факторов в разных популяциях.

Полиморфизм генов гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов и чувствительность к лечению антагонистами гликопротеинового рецептора

Блокаторы IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов являются самой молодой группой из всего класса антиагрегационных препаратов, используемых в кардиологии. Механизм действия средств этой группы заключается в торможении общего конечного этапа агрегации тромбоцитов – процесса построения тромбоцитарного тромба посредством образования мостиков между соседними активированными тромбоцитами из

молекул фибриногена (рис. 5). Препараты из группы блокаторов IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов к настоящему времени прошли серьезную проверку эффективности во многих клинических исследованиях. Применение средств этой группы в качестве дополнения к стандартным методикам антиагрегационной терапии при инвазивной тактике ведения больного с острым коронарным синдромом приводит к существенному достоверному улучшению исходов заболевания.

Известно, что у гомозиготных носителей *PLA2*-аллеля гена тромбоцитарного гликопротеина IIb/IIIa наблюдается резистентность к аспирину. В то же время показано, что у носителей *PLA2* аллеля при приеме блокатора рецептора тромбоцитов IIb/IIIa (орбофибан) не развивается такое осложнение, как кровотечение (O'Connog *et al.*, 2001). В связи с этим в клинической практике при лечении больных ОКС для выбора той или иной группы антиагрегационных препаратов было бы полезным знание генотипа гена тромбоцитарного гликопротеина IIb/IIIa.

Литература

- Струкова С.М. Современные представления о механизмах свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2002. № 1. (<http://trombos.narod.ru/journal/002.htm>.)
- Пархоменко А.Н. Патогенез острого тромбоза в венечных артериях сердца: представления о патогенезе острого коронарного синдрома // Украинский кардиологический журнал. 2002. № 3.

- (http://rql.net.ua/cardio_j/2002/D3/parkhomenko.htm)
- Afshar-Khargan V., Khoshnevis-A.M., Hopkins P., Lopez J.A. Polymorphism of the platelet glycoprotein (GP) Ib alpha Kozak sequence determines the surface level of the GP Ib-IX-V complex and risk for early myocardial infarction // *Blood*. 1998. V. 92. P. 702–712.
- Andrews R.K., Berndt M.C. Platelet physiology and thrombosis // *Thrombosis Res*. 2004. V. 114. P. 447–453.
- Bennett J.S., Catella-Lawson F., Rut A.R. *et al.* Effect of the P1A2 alloantigen on the function of β_3 -integrins in platelets // *Blood*. 2001. V. 97. P. 3093–3099.
- Bhatt D.L., Topol E.J. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003. V. 2. P. 15–28. available at <http://mglinets.narod.ru/syndroms/therapy/thrombos.htm>
- Bottiger C., Kastrati A., Koch W. *et al.* HPA-1 and HPA-3 polymorphism of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction // *Thromb. Haemost.* 2000. V. 83. P. 559–562.
- Bussel J.B., Kunicki T.J., Michelson A.D. Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease // *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*. 2000. P. 222–240.
- Cadroy Y., Sakariassen K.S., Charlet J.P. *et al.* Role of 4 platelet membrane glycoprotein polymorphisms on experimental arterial thrombus formation in men // *Blood*. 2001. V. 98. P. 3159–3161.
- Carlsson L.E., Greinacher A., Spitzer C. *et al.* Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand factor (GPIb/IX) and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke // *Stroke*. 1997. V. 28. P. 1392–1395.
- Carter A.M., Catto A.J., Bamford J.M., Grant P.J. Association of the platelet glycoprotein IIb HPA-3 polymorphism with survival after ischemic stroke // *Stroke*. 1999. V. 30. P. 2606–2611.
- Carter A.M., Ossei-Gerning N., Grant P.J. Platelet glycoprotein IIIa P1A polymorphism in young men with myocardial infarction // *Lancet*. 1996. V. 348. P. 485–486.
- Carter A.M., Ossei-Gerning N., Wilson I.J., Grant P.J. Association of the platelet P1(A) polymorphism of glycoprotein IIb/IIIa and the fibrinogen Bb448 polymorphism with myocardial infarction and extent of coronary artery disease // *Circulation*. 1997. V. 96. P. 1424–1431.
- Corral J., Gonzalez-Conejero R., Lozano M.L. *et al.* New alleles of the platelet glycoprotein Iba gene // *British J. Haematol.* 1998. V. 103. P. 997–1003.
- Croft S.A., Hampton K.K., Sorrell J.A. *et al.* The GpIa C807T dimorphism associated with platelet collagen receptor density is not a risk factor for myocardial infarction // *British J. Haematol.* 1999. V. 106. P. 771–776.
- Farrell D.H., Thiagarajan P., Chung D.W., Davie E.W. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 10729–10732.
- Fitzgerald L.A., Philips D.R. Platelet membrane glycoproteins // *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice* / Ed. R.W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, E.W. Saizman. JB Lippincott, Philadelphia, 2nd ed., 1987. P. 572–593.
- Furihata K., Nugent D.J., Kunicki T.J. Influence of platelet collagen receptor polymorphisms on risk for arterial thrombosis // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2002. V. 126. P. 305–309.
- Gardeman A., Humme J., Stricker J. *et al.* Association of the platelet glycoprotein IIIa P1A1/A2 gene polymorphism to coronary artery disease but not to nonfatal myocardial infarction in low risk patients // *Thromb. Haemost.* 1998. V. 80. P. 214–217.
- Goldschmidt-Clermont P.J., Shear W.S., Shwartzberg J. *et al.* Clues to the death of an Olympic champion // *Lancet*. 1996. V. 348. P. 485–486.
- Gonzalez-Conejero R., Lozano M.L., Rivera J. *et al.* Polymorphisms of platelet membrane glycoprotein Iba associated with arterial thrombotic disease // *Blood*. 1998. V. 92. P. 2771–2776.
- Gruchala M., Cieciewicz D., Ochman K. *et al.* Association between the P1 platelet glycoprotein GPIIIa polymorphism and extent of coronary artery disease // *Intern. J. Cardiol.* 2003. V. 88. P. 229–237.
- Herrmann S.M., Poirier O., Marques-Vidal P. *et al.* The Leu 33/Pro polymorphism (P1A1/P1A2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 77. P. 1179–1181.
- Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors // *Cells*. 1987. V. 48. P. 549–554.
- Ishida F., Ito T., Takei M. *et al.* Genetic linkage of Kozak sequence polymorphism of the platelet glycoprotein Iba with human platelet antigen-2 and variable number of tandem repeats polymorphism, and its relationship with coronary artery disease // *British J. Haematol.* 2000. V. 111. P. 1247–1249.
- Jacquelin B., Tarantino M., Kritzik M. *et al.* Allele-dependent transcriptional regulation of the human integrin α_2 gene // *Blood*. 2001. V. 97. P. 1721–1726.
- Jandrot-Perrus M., Busfield S., Lagrue A.H. *et al.* Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily // *Blood*. 2000. V. 96. P. 1798–1807.
- Jilma-Stohlawetz P., Homoncik M., Jilma B. *et al.* Glycoprotein Ib polymorphisms influence platelet plug formation under high shear rates // *British J.*

- Haematol. 2003. V. 120. P. 652–655.
- Kiefel V., Vicariot M., Giovangrandi Y. *et al.* Alloimmunization against Iy, a low-frequency antigen on platelet glycoprotein Ib/IX as a cause of severe neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura // *Vox Sang.* 1995. V. 69. P. 250–254.
- Knight C.G., Morton L.F., Onley D.J. *et al.* Collagen-platelet interaction: Gly-Pro-Hyp is uniquely specific for platelet GpVI and mediates platelet activation by collagen // *Cardiovasc. Res.* 1999. V. 41. P. 450–457.
- Kritzik M., Savage B., Nugent D.J. *et al.* Nucleotide polymorphisms in the alpha 2 gene define multiple alleles which are associated with differences in platelet alpha 2 beta 1 // *Blood.* 1998. V. 92. P. 2382–2388.
- Kuijpers R.W.A.M., Faber N.M., Cuypers H.T.M. *et al.* NH2-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Iba has a methionine145/threonine145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens // *J. Clin. Invest.* 1992. V. 89. P. 381–384.
- Kunicki T.J., Orzechowski R., Annis D., Honda Y. Variability of integrin alpha 2 beta 1 activity on human platelets // *Blood.* 1993. V. 82. P. 2693–2703.
- Lane D.A., Grant P.J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease // *Blood.* 2000. V. 95. P. 1517–1532.
- Lefkovits J., Plow E.F., Topol E.J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine // *N. Engl. J. Med.* 1995. V. 332. P. 1553–1559.
- Lopez J.A., Ludwig E.H., McCarthy B.J. Polymorphism of human glycoprotein Iba results from a variable number of tandem repeats of a 13-amino acid sequence in the mucin-like macroglycopeptide region // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 10055–10061.
- Lyman S., Aster R.H., Visentin G.P., Newman P.J. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system // *Blood.* 1990. V. 75. P. 2343–2348.
- Marian A.J., Brugada R., Kleiman N.S. Platelet glycoprotein IIIa P1A polymorphism and myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* 1996. V. 335. P. 1071.
- Meyr D., Girma J.P. von Willebrand factor: structure and function // *Thromb. Haemost.* 1993. V. 70. № 1. P. 99–104.
- Michelson A.D., Furman M.I., Goldschmidt-Clermont P. *et al.* Platelet GP IIIa P1A polymorphisms display different sensitivities to agonists // *Circulation.* 2000. V. 101. P. 1013–1018.
- Modderman P.W., Admiraal L.G., Sonnenberg A., Von dem Borne A.E.G.K. Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 364–369.
- Moroi M., Jung S.M., Yoshida N. Genetic polymorphism of platelet glycoprotein Ib // *Blood.* 1984. V. 64. P. 622–629.
- Moshfegh K., Wuillemin W.A., Redondo M. *et al.* Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study // *Lancet.* 1999. V. 353. P. 351–354.
- Murata M., Matsubara Y., Kawano K. *et al.* Coronary artery disease and polymorphisms in a receptor mediating shear stress-dependent platelet activation // *Circulation.* 1997. V. 96. P. 3281–3286.
- Newman P.J. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors // *Lancet.* 1997. V. 349. P. 370–384.
- Newman P.J., Derbes R.S., Aster R.H. The human platelet alloantigens, PLA1 and PLA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 83. P. 1778–1781.
- Noris P., Simsek S., de Bruijne-Admiraal L.G. *et al.* Maxa, a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia // *Blood.* 1995. V. 86. P. 1019–1026.
- O'Connor F.F., Shields D.C., Fitzgerald A. *et al.* Genetic variation in glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) as a determinant of the responses to an oral GPIIb/IIIa antagonist in patients with unstable coronary syndromes // *Blood.* 2001. V. 98. P. 3256–3260.
- Park S., Park H.Y., Park C. *et al.* Association of the gene polymorphisms of platelet glycoprotein Ia and IIb/IIIa with myocardial infarction and extent of coronary artery disease in Korean population // *Yonsei Medical J.* 2004. V. 45. № 3. P. 428–434.
- Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule // *Nature.* 1984. V. 309. P. 30–33.
- Ridker P.M., Hennekens C.H., Schmitz C. *et al.* P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis // *Lancet.* 1997. V. 349. P. 385–388.
- Ruggeri Z.M., Zimmerman T.S., Russell S. *et al.* Von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib complex // *Methods Enzymol.* 1992. V. 215. P. 263–275.
- Samani N.J., Lodwick D. Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction // *Cardiovasc. Res.* 1997. V. 33. P. 693–697.
- Santoso S., Kunicki T.J., Kroll H. *et al.* Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients // *Blood.* 1999. V. 93. P. 2449–2453.
- Schmugge M., Margaret L., Rand J.F. Platelets and von

- Willebrand factor // *Transfusion and Apheresis Sci.* 2003. V. 28. P. 269–277.
- Slowik A., Dziedzic T., Turaj W. *et al.* A2 allele of GpIIIa gene is a risk factor for stroke caused by large-vessel disease in males // *Stroke.* 2004. V. 35. P. 1589–1593.
- Smyth S.S., Joneckis C.C., Parise L.V. Regulation of vascular integrins // *Blood.* 1993. V. 81. P. 2827–2843.
- von Beckerath N., Koch W., Mehilli J., Bottiger C. *et al.* Glycoprotein Ia gene C807T polymorphism and risk for major adverse cardiac events within the first 30 days after coronary artery stenting // *Blood.* 2000. V. 95. P. 3297–3301.
- Weisel J.W., Nagaswami C., Vilaire G., Bennett J.S. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 16637–16643.
- Weiss E.J., Bray P.F., Tayback M. *et al.* A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis // *N. Engl. J. Med.* 1996. V. 334. P. 1090–1094.

PLATELET MEMBRANE GLYCOPROTEIN RECEPTORS: FUNCTIONS AND POLYMORPHISM

E.N. Voronina¹, M.L. Filipenko¹, D.S. Sergeevichev¹, I.V. Pikalov²

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: max@niboch.nsc.ru; ² Novosibirsk Government Medical Academy,
Clinical Diagnostics Department

Summary

Studying of molecular-biological aspects of human cells and physiological systems has led to opening of new blood coagulation inhibitors, new family of the receptors activated by clotting factors, new functions of known adhesive proteins and to development of new knowledge about mechanisms of a hemostasis and clotting. In the given paper the role membrane receptors of platelet in formation of a blood clot is briefly described, of their genes and their possible role in pathologies connected with infringement of platelets aggregation are considered.