

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

**ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА НОТРОМБЕЛ НА ЭКСПРЕССИЮ
МЕМБРАННОГО КОМПЛЕКСА GPIb-IX-V ТРОМБОЦИТАМИ,
АКТИВИРОВАННЫМИ ТРОМБИНОМ**

© О. С. Веселкина,¹ Н. Н. Петрищев,² Л. В. Васина,² М. Е. Боровитов,¹
А. В. Селютин,³ С. В. Чепанов,³ С. А. Сельков³

¹ ЗАО «ВЕРТЕКС», Санкт-Петербург, Россия

² Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: lubov.vasina@gmail.com

³ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия

Исследовано влияние препарата нотромбел на экспрессию мембранного комплекса GPIb-IX-V тромбоцитами, активированными тромбином. Установлено, что нотромбел уменьшает экспрессию комплекса GPIb-IX-V на мембране активированных тромбоцитов. Ингибирующее влияние нотромбела на экспрессию GPIb (CD42b) сопоставимо с активностью препарата в отношении GPIX (CD42a) и составило 43 %. В отношении GPV (CD42d) ингибирующее влияние препарата было менее выражено и составило 22 %. Возможными мишенями для нотромбела являются тромбоксановый (тромбоксансинтаза) путь передачи сигнала активации, а также непосредственно мембранные рецепторы GPIb-IX-V.

Ключевые слова: нотромбел, GPIb-IX-V, тромбоциты, тромбин.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 102. № 5. С. 000—000. 2016

O. S. Veselkina,¹ N. N. Petrishchev,² L. V. Vasina,² M. E. Borovitev,¹ A. V. Seljutin,³ S. V. Chepanov,³ S. A. Sel'kov.³ NOTHROMBEL EFFECT ON THE EXPRESSION OF MEMBRANE COMPLEX GPIb-IX-V PLATELETS ACTIVATED BY THROMBIN. ¹ CJSC «VERTEKX» company, St. Petersburg, Russia; ² Almazov Federal North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russia, e-mail: lubov.vasina@gmail.com; ³ The Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D. O. Ott, St. Petersburg, Russia.

The influence of Nothrombel on the expression of membrane complex GPIb-IX-V of platelets activated by thrombin was studied. It is established that Nothrombel reduced thrombin-induced expression of complex GPIb-IX-V on the membrane of the activated platelets. The inhibitory activity of Nothrombel on the expression of GPIb (CD42b) was comparable to its activity with respect to GPIX (CD42a) and is equal to 43 %. With regard to GPV (CD42d) inhibitory effect of the drug was less pronounced and is equal to 22 %. The possible targets for Nothrombel are activation of thromboxane signaling pathway, as well as GPIb-IX-V receptors of platelets itself.

Key words: Nothrombel, GPIb-IX-V, platelets, thrombin.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 102. N 5. P. 000—000. 2016

В настоящее время остается актуальным поиск препаратов, обладающих способностью подавлять адгезию тромбоцитов к поврежденной стенке сосудов и, таким образом, ингибировать тромбообразование.

Большое значение в инициации адгезии тромбоцитов имеет активация мембранных гликопротеиновых рецепторов Ib-IX-V (GPIb-IX-V) и образование комплекса с фактором Виллебранда (vWF). Значимость комплекса GPIb-IX-V с vWF в тромбообразовании подтверждена клинически, в частности при болезни Виллебранда и при болезни Бернара-Сулье [21].

Комплекс GPIb-IX-V с vWF определяет контактную активацию тромбоцитов в сосудах с высокой скоростью сдвига, а также способствует формированию тромбоцитарных и тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов и их связыванию с эндотелием и коллагеном [3, 5, 13, 15–17].

Активация GPIb-IX-V — это один из важнейших факторов, обуславливающих роль тромбоцитов не только в патогенезе тромбоза, но и воспаления, ишемии, метастазирования опухолей и других патологических процессов [5, 18, 22].

В этой связи понятно, что исследование GPIb-IX-V как мишени для анти-тромботической терапии остается актуальной задачей [3, 6, 14].

Ранее нами показано [1], что N,N'-замещенные пиперазины ингибируют тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов.

Целью данной работы явилось изучение влияния 4-(2.3.4.5-тетраметоксибензоил)пиперазин-1-карбоксимидамид (2E)-бут-2-ендиоат гидрата (препарат нотромбел) на экспрессию мембранного комплекса GPIb-IX-V тромбоцитами, активированными тромбином.

МЕТОДИКА

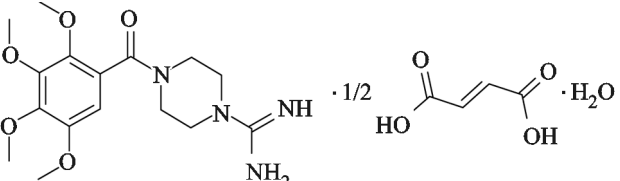
Нотромбел синтезирован, как описано нами ранее в работе [1]. Структурная формула препарата нотромбел представлена в табл. 1.

Расчет значений IgP, IgD и pKa проводили по программе, приведенной на сервере chemicolize.org (chemAxon). Подлинность препарата подтверждена методом ЯМР-спектроскопии, чистота — методом ВЭЖХ. Содержание основного вещества составляло 99.9%. Кровь для исследования брали у доноров ($n = 5$), лиц обоего пола в возрасте 20—35 лет, не получавших в течение 7—10 суток препаратов, влияющих на функцию тромбоцитов. Для предотвращения активации тромбоцитов использовали вакуумные пробирки, содержащие буферный раствор цитрата натрия 3.8% (0.129 М), соотношение цитрат натрия: кровь было 1:9.

Для приготовления растворов нотромбела с концентрацией 50.0 мкмоль/мл использовали 0.05 М раствор Трис-НСl, pH 7.4. Растворы с более низкой концентрацией (25, 12.5 и 6.25 мкмоль/мл) готовили путем разбавления концентрированного раствора тем же раствором Трис-НСl.

Т а б л и ц а 1

Структурная формула препарата нотромбел

Структурная формула	ММ	IgP	IgD	pKa
	410.43	-0.5	-2.77	11.55

Уровень экспрессии комплекса GPIb-IX-V на тромбоцитах, активированных тромбином, определяли методом проточной цитометрии, используя моноклональные антитела к антигенам дифференцировки CD42b, CD42a и CD42d (American Diagnostica, США). В качестве индуктора использовали тромбин (Chrono-par Thrombin reagent, Chrono-Log Corporation, США). Цитометрический анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (США). Количество тромбоцитов, содержащихся в образце, определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния.

Подготовка проб. Для получения богатой тромбоцитами плазмы стабилизированную кровь центрифугировали со скоростью 1000 об/мин (140—160 g) в течение 5—7 мин.

Для приготовления контрольного образца смешивали 50 мкл плазмы, богатой тромбоцитами, 130 мкл дилуэнта (реагент 1) и 20 мкл тромбина (конечная концентрация 0.1 U/мл), общий объем составил 200 мкл.

Для оценки влияния нотромбела на уровень экспрессии комплекса GPIb-IX-V смешивали 50 мкл богатой тромбоцитами плазмы, 110 мкл дилуэнта (реагент 1, Chrono-par Thrombin reagent), 20 мкл тромбина (конечная концентрация 0.1 U/мл) и 20 мкл раствора нотромбела. Конечная концентрация препарата составляла 5, 2.5, 1.25 и 0.625 мкмоль/мл. Образцы инкубировали при комнатной температуре 10 мин, проводили окрашивание моноклональными антителами в соответствии с методическими рекомендациями. Кратко: смешивали 25 мкл тромбовзвеси, преинкубированной с препаратом и тромбином, 55 мкл дилуэнта и 10 мкл антител к CD42b, CD42a и CD42d, перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре, добавляли 10 мкл антител, конъюгированных с FITC, перемешивали, инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Доводили объем дилуэнта до 1 мл и анализировали на проточном цитометре.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica/w6.0 фирмы StatSoft, Inc. (США) с использованием критерия Манна—Уитни. Вычисление EC_{50} проводили с помощью программы IBMSPSS Statistics 20 (США) по уравнению зависимости величины эффекта от концентрации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данном исследовании уровень экспрессии активационных маркеров тромбоцитов CD42a, CD42b, CD42d оценивали по показателям средней интенсивности флуоресценции интактных тромбоцитов, обработанных в соответствии с протоколом иммунофенотипирования (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

Влияние нотромбела на экспрессию активационных маркеров тромбоцитов CD42a, CD42b, CD42d

Маркеры тромбоцитов	Интенсивность флуоресценции, отн. ед				
	Контроль	концентрация нотромбела, мкмоль/мл			
		0.625	1.25	2.5	5.0
CD42a (GPIX)	14487 ± 72	14427 ± 42	13515 ± 35*	10275 ± 79*	8339 ± 91*
CD42b (GPIb)	10606 ± 31	10152 ± 21*	10115 ± 84*	9043 ± 100*	6027 ± 82*
CD42d (GPV)	1852 ± 63	1840 ± 25.6	1808 ± 17*	1658 ± 42*	1437 ± 52*

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

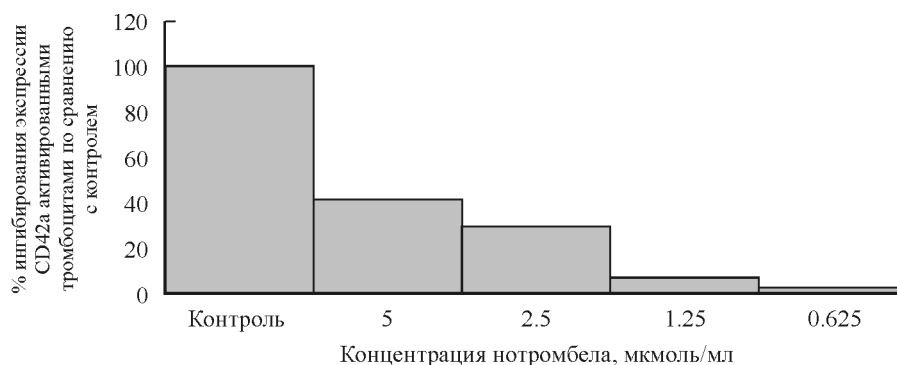


Рис. 1. Влияние нотромбела на экспрессию CD42a активированными тромбоцитами (% от контроля).

Как видно из представленных данных, нотромбел оказывал статистически значимое ингибирующее влияние на экспрессию CD42a ($EC_{50} = 5.2$ мкмоль/мл), CD42b ($EC_{50} = 5.1$ мкмоль/мл) и CD42d ($EC_{50} = 6.2$ мкмоль/мл), $p < 0.05$.

Выраженность ингибирующего действия нотромбела на экспрессию CD42a при концентрации 5 мкмоль/мл составила 43 %, при концентрации 2.5 мкмоль/мл — 29 %, при концентрации 1.25 мкмоль/мл — 7 % и при концентрации 0.625 мкмоль/мл — 1 % (рис. 1).

Ингибирующая активность нотромбела на экспрессию CD42b была сопоставима с активностью препарата в отношении CD42a и составила 43 % при концентрации 5 мкмоль/мл, 14 % при концентрации 2.5 мкмоль/мл, 5 % при концентрации 1.25 мкмоль/мл и 3 % — при концентрации 0.625 мкмоль/мл (рис. 2).

При концентрациях 5—1.25 мкмоль/мл нотромбел в меньшей степени влиял на экспрессию CD42d. Ингибирующая способность препарата составила 22 % при концентрации 5 мкмоль/мл, 10 % при концентрации 2.5 мкмоль/мл, 2 % при концентрации 1.25 мкмоль/мл и 1 % при концентрации 0.625 мкмоль/мл (рис. 3).

Таким образом, нотромбел оказывает ингибирующее влияние на экспрессию мембранного комплекса GPIb-IX-V активированными тромбоцитами. Эффект был менее выражен в отношении GPV.

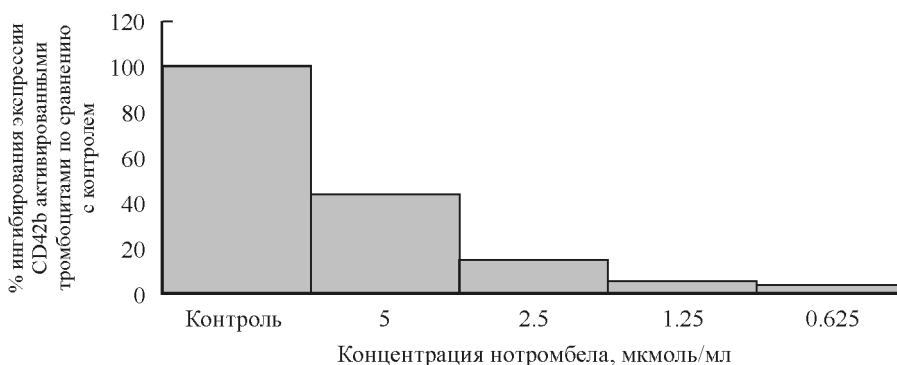


Рис. 2. Влияние нотромбела на экспрессию CD42b активированными тромбоцитами (% от контроля).

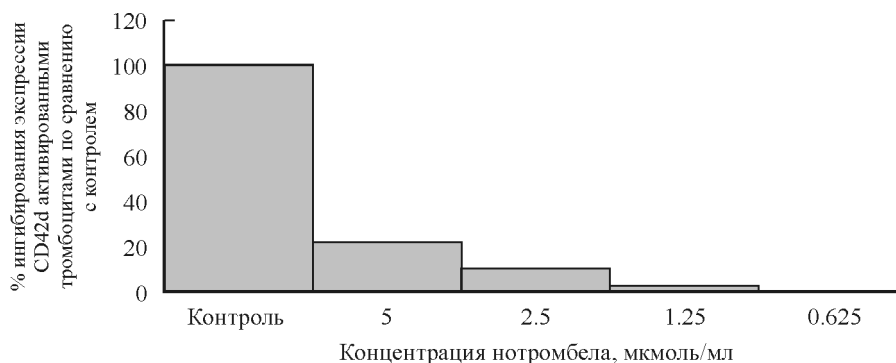


Рис. 3. Влияние нотромбела на экспрессию CD42d активированными тромбоцитами (% от контроля).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Тромбин активирует тромбоциты не только путем взаимодействия тромбина с PAR-рецепторами, но и в результате взаимодействия тромбина и гликопротеина Ib в мембранном комплексе Ib-IX. Считается, что воздействие тромбина на данный рецептор приводит к активации тромбоцитов независимо от PAR-рецепторов [10, 11].

Тромбоцитарный мембранный комплекс GPIb-IX-V относится к семейству гликопротеинов, богатых лейцином. GPIb (CD42b) представляет собой основной сиалосодержащий белок плазматической мембраны, в молекуле которого имеются места связывания тромбина, фибрина и некоторых коагуляционных факторов [4]. Главной функцией GPIb является способность связываться через фактор Виллебранда плазмы с коллагеном субэндотелия с последующей передачей сигнала на тромбоцитарные интегрины $\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_2\beta_1$, которые становятся компонентами для связывания лигандов, в первую очередь — vWF и фибрина, что ускоряет агрегацию тромбоцитов [19, 23].

GPIIX (CD42a) обеспечивает связь комплекса с актином, а GPV (CD42d) регулирует связь комплекса с α -тромбином.

Активация GPIb/IX/V и связывание тромбина с GPIb/IX/V инициируют арахидоновый каскад и образование тромбоксана A_2 , что в свою очередь ведет к высвобождению содержимого α -гранул тромбоцитов, дополнительной секреции vWF, P-селектина, АДФ, серотонина и других агонистов, а также к ускорению коагуляции на поверхности активированных тромбоцитов и развитию тромба [8, 9, 20]. Агонисты в свою очередь через G-связанные рецепторы дополнительно активируют GPIIb-IIIa-зависимую агрегацию тромбоцитов.

Учитывая полученные нами ранее данные о влиянии нотромбела на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов, можно предположить, что ингибирующий эффект препарата реализуется в том числе и через тромбоксановый путь передачи сигнала активации [2].

Наличие выраженного дозозависимого ингибирующего влияния нотромбела на экспрессию мембранного комплекса GPIb-IX-V тромбоцитов, активированных тромбином, свидетельствует о возможности непосредственного блокирующего воздействия препарата на GPIb-IX-V.

Известно [24], что активация тромбоцитов приводит к увеличению переноса молекул P-селектина из α -гранул на поверхность плазматической мембраны, вследствие чего усиливается взаимодействие тромбоцитов с факторами коагуляции. P-селектин также является агонистом тромбоцитарного рецептора GPIb/IX/V и лейкоцитарного рецептора PSGL-1, что способствует «привлечению» лейко-

цитов в область интимы повреждения сосудов. В предыдущих исследованиях было установлено, что нотромбел ингибирует транслокацию Р-селектина на мембране тромбоцитов, активированных тромбином, при концентрации выше 0.5 мкмоль/мл.

В настоящее время ведутся активные поиски препаратов, способных влиять на адгезию тромбоцитов, препятствуя их взаимодействию с компонентами субэндотелия поврежденной сосудистой стенки. В частности, эти взаимодействия могут быть устранены блокадой тромбоцитарного рецептора GPIIb/IIIa рекомбинантным доменом A1 vWF (VCL) или моноклональными антителами к GPIIb/IIIa [7], антагонистами гликопротеина GPVI, играющего важную роль в адгезии тромбоцитов в сосудах с низкой скоростью сдвига [12].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о возможности уменьшения адгезии тромбоцитов к структурам поврежденной стенки сосудов через ингибирование препаратом нотромбел мембранного комплекса GPIIb-IX-V.

Исходя из вышеизложенного дальнейшее исследование ингибирования препаратом нотромбел начальных стадий тромбоцитарного гемостаза является перспективным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Веселкина О. С., Викторов Н. Б., Петрищев Н. Н., Поплавская Ю. В.* Вещество, обладающее сочетанной антиагрегантной, антикоагулянтной и вазодилаторной активностью, N,N'-замещенные пиперазины и способ их получения. Патент RU 2 469 029.
- [2] *Веселкина О. С., Петрищев Н. Н., Васина Л. В., Боровитов М. Е., Селютин А. В., Чепанов С. В., Сельков С. А.* Влияние новых соединений N,N'- замещенных пиперазинов на тромбин-индуцированную активацию тромбоцитов. Эксперим. клинич. фармакология. 77 (8): 28—33. 2014.
- [3] *Andrews R. K., Gardiner E. E., Shen Y., Berndt M. C.* Platelet interactions in thrombosis. *IUBMB Life*. 56 (1): 13—18. 2004.
- [4] *Andrews R. K., Gardiner E. E., Shen Y., Whisstock J. C., Berndt M. C.* Glycoprotein Ib-IX-V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35: 1170—1174. 2003.
- [5] *Berndt M. C., Shen Y., Dopheide S. M., Gardiner E. E., Andrews R. K.* The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb. Haemost.* 86 (1): 178—188. 2001.
- [6] *Bonnefoy A., Vermeylen J., Hoylaerts M. F.* Inhibition of von Willebrand factor — GpIb/IX/V interaction as a strategy to prevent arterial thrombosis. *Exp. Rev. Cardiovasc. Ther.* 1 (2): 257—269. 2003.
- [7] *David T., Ohlmann P., Eckly A., Moog S., Cazenave J-P., Gachet C., Lanza F.* Inhibition of adhesive and signaling function of the platelet GPIIb-V-IX complex by a cell penetrating GPIIb peptide. *J. Thromb. Haemost.* 4: 2645—2655. 2006.
- [8] *Dormann D., Clemetson K. J., Kehrel B. E.* The GPIIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 96 (7): 2469—2478. 2000.
- [9] *Estevez B., Stojanovic-Terpo A., Delaney M. K., O'Brien K. A., Berndt M. C., Ruan C., Du X.* LIM kinase-1 selectively promotes glycoprotein Ib-IX-mediated TXA₂ synthesis, platelet activation, and thrombosis. *Blood*. 121 (22): 4586—4594. 2013.
- [10] *Estevez B., Kim K., Delaney M. K., Stojanovic-Terpo A., Shen B., Ruan C., Cho J., Ruggeri Z. M., Du X.* Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation. *Blood*. 127 (5): 626—636. 2016.
- [11] *Estevez B., Delaney M. K., Stojanovic-Terpo A., Du X.* A platelet glycoprotein Ib-IX-specific 14-3-3/Rac1/LIMK1 signaling pathway promotes thrombin-induced platelet activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35: A598. 2015.
- [12] *FitzGerald G. A., Morgan N.* Molecular mechanisms of platelet activation and inhibition. In: *Hemostasis and thrombosis*. Colman R. W., Hirsh J., Marder V. (eds). 4-th ed. Chapter 90. Philadelphia, Baltimore, New York. A Wolters Kluwer Company: 1517—1527. 2001.
- [13] *Gawaz M.* Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc. Res.* 61 (3): 6498—6511. 2004.
- [14] *Gresele P.* Inhibitors of the interaction between von Willebrand factor and platelet GPIIb/IX/V. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin. Springer: 287—309. 2012.

- [15] *Kroll M. H., Hellums J. D., McIntire L. V., Schafer A. I., Moake J. L.* Platelets and shear stress. *Blood*. 88 (5): 1525—1541. 1996.
- [16] *Leckband D. E.* Beyond structure: mechanism and dynamics of intercellular adhesion. *Biochem. Soc. Trans.* 36 (Pt 2): 213—220. 2008.
- [17] *McRedmond J. P., Park S. D., Reilly D. F., Coppinger J. A., Maguire P. B., Shields D. C., Fitzgerald D. J.* Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol. Cell. Proteomics*. 3: 133—144. 2004.
- [18] *Nording H. M., Seizer P., Langer H. F.* Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front. Immunol.* 6: 1—11. 2015.
- [19] *Pampori N., Hato T., Stupack D. G., Aidoudi S., Cheresch D. A., Nemerow G. R., Shattil S. J.* Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha (V) beta (3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J. Biol. Chem.* 274: 21 609—21 616. 1999.
- [20] *Ramakrishnan V., DeGuzman F., Bao M., Hall S., Leung L., Phillips D.* A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98: 1823—1828. 2001.
- [21] *Ramasamy I.* Inherited bleeding disorders of platelet adhesion and aggregation. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49 (1): 1—35. 2004.
- [22] *Romo G. M., Dong J. F., Schade A. J., Gardiner E. E., Kansas G. S., Li C. Q., McIntire L. V., Berndt M. C., Lopez J. A.* The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J. Exp. Med.* 190: 803—814. 1999.
- [23] *Sivaraman B., Latour R. A.* Delineating the role of the GPIIb/IIIa and GPIb/IX/V platelet receptors in mediating platelet adhesion to adsorbed fibrinogen and albumin. *Biomaterials*. 32: 5365—5370. 2011.
- [24] *Zarbock A., Polanowska-Grabowska R. K., Ley K.* Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 21 (2): 99—111. 2007.

Поступила 3 II 2016
После доработки 21 III 2016