

Адгезия тромбоцитов, опосредованная фактором фон Виллебранда, у пациентов с ранним развитием ишемической болезни сердца

DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2023.02.0006

© С.Д. Охота¹, С.Г. Козлов¹, Ю.Н. Автаева¹, И.С. Мельников^{1,2}, К.Г. Гурия¹, З.А. Габбасов¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, г. Москва

² ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН», г. Москва

Для цитирования: Сергей Денисович Охота – ORCID 0000-0002-0744-8188, Сергей Геннадьевич Козлов – ORCID 0000-0001-8800-1670, Юлия Николаевна Автаева – ORCID 0000-0002-3701-9747, Иван Сергеевич Мельников – ORCID 0000-0001-5241-3091, Константин Георгиевич Гурия – ORCID 0000-0001-9475-0715, Зуфар Ахнафович Габбасов – ORCID 0000-0003-3878-2573. Адгезия тромбоцитов, опосредованная фактором фон Виллебранда, у пациентов с ранним развитием ишемической болезни сердца. Атеросклероз и дислипидемии. 2023;2(51):54-64. DOI: 10.34687/2219-8202.JAD.2023.02.0006.

Абстракт

Изучение опосредованной фактором фон Виллебранда (ФВ) адгезии тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ишемической болезни сердца (ИБС).

Материалы и методы. В исследование были включены 84 пациента со стабильной ИБС, в том числе 62 мужчины в возрасте до 55 лет с манифестацией ИБС до 50 лет, а также 22 женщины в возрасте до 65 лет с манифестацией ИБС до 60 лет. В контрольную группу вошли 64 пациента (26 мужчин до 55 лет и 38 женщин до 65 лет) без ИБС. У всех пациентов исследовали адгезию тромбоцитов к коллагеновой поверхности при скорости сдвига 1300 с^{-1} посредством оценки 15-минутного значения интенсивности рассеянного лазерного излучения от покрытой коллагеном оптической подложки в проточной камере микрофлюидного устройства по истечении 16-минутной циркуляции цельной крови в ней. У пациентов обеих групп проведено сопоставление выраженности снижения адгезии тромбоцитов после добавления в кровь моноклональных антител (мАт) к рецепторам тромбоцитов гликопротеинам Ib (GPIb), блокирующих взаимодействие этих рецепторов с ФВ.

Результаты. У пациентов с ранним развитием ИБС снижение адгезии тромбоцитов после блокирования рецепторов GPIb тромбоцитов составило 77% (57,2; 84,6), у пациентов контрольной группы – 29,5% (-6,9; 59,3) ($p < 0,001$). Медиана снижения адгезии тромбоцитов после блокирования рецепторов GPIb составила 62% (50,5; 68,3). С поправкой на традиционные факторы риска ИБС, снижение $\geq 62\%$ адгезии тромбоцитов после блокирования рецепторов GPIb увеличивало вероятность наличия раннего развития ИБС (ОШ 5,2; 95% ДИ: 2,1-12,6; $p < 0,001$). Уровень ФВ в крови не влиял на адгезию тромбоцитов до и после добавления мАт к GPIb.

Заключение. Более выраженное снижение при повышенной скорости сдвига адгезии тромбоцитов в ответ на блокирование взаимодействия их рецепторов GPIb с ФВ у пациентов с ранним развитием ИБС, в сравнении с пациентами без этого заболевания, указывает на возможную роль «чрезмерного» взаимодействия ФВ с тромбоцитами в патогенезе раннего развития ИБС.

Ключевые слова: фактор фон Виллебранда; адгезия тромбоцитов; ишемическая болезнь сердца.

Platelet adhesion mediated by von Willebrand factor in patients with early onset coronary heart diseaseS.D. Okhota¹, S.G. Kozlov¹, Yu.N. Avtaeva¹, I.S. Melnikov^{1,2}, K.G. Guria¹, Z.A. Gabbasov¹¹ National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow, Russia.² State scientific center of the Russian Federation – Institute of biomedical problems of Russian Academy of Sciences. Moscow, Russia**Abstract****Objective:** To study von Willebrand factor (VWF)-mediated adhesion of platelets to collagen surface under conditions of high shear rates in patients with premature coronary artery disease (CAD).**Materials and Methods:** The study included 84 patients with stable CAD, including 62 men under the age of 55 years with manifestation of CAD before age 50, and 22 women under the age of 65 years with manifestation of CAD before age 60. The control group included 64 patients: 26 men under 55 and 38 women under 65 without CAD. Whole blood samples were placed into the microfluidic device with a pump. Blood was perfused through the cell over surface coated with collagen at shear rate of 1300 s⁻¹. The platelet adhesion was measured by the intensity of scattered laser light after 15-minute blood circulation. Measurements were performed before and after addition of monoclonal antibodies (mAb) to platelet glycoprotein (GP) Ib receptors into blood samples and then compared between the two groups.**Results:** After the addition of mAb to platelet GPIb receptors to blood samples, platelet adhesion decreased by 77% (57.2; 84.6) in patients with premature CAD and by 29.5% (-6.9; 59.3), in control patients (p<0.001). After adjusting for traditional risk factors, the decrease in platelet adhesion equal or above the median value was strongly associated with premature CAD (OR=5.2, 95% CI 2.1–12.6; p <0.001). Plasma levels of VWF did not affect platelet adhesion before and after the addition of mAb to GPIb.**Conclusion:** More pronounced decrease at increased rate with platelets adhesion in response to blocking their GPIb receptors with VWF in patients with early development of CAD, by comparison for patients without this disease, indicates on the possible role of “excessive” interactions of VWF with platelets in the pathogenesis of early development of CAD.**Key words:** von Willebrand factor; platelet adhesion; coronary artery disease.

К преждевременной (термин, используемый в англоязычной литературе) или рано развившейся ИБС относят ИБС, возникшую в возрасте до 55 лет у мужчин или до 65 лет у женщин [1]. К факторам, способствующим ее раннему возникновению, может относиться состояние системы гемостаза, а именно повышенная склонность к тромбообразованию. Одним из ключевых факторов системы гемостаза, принимающим участие в тромбообразовании, является фактор фон Виллебранда (ФВ). ФВ – белок плазмы, который является связующим звеном между тромбоцитами и субэндотелиальным коллагеном в местах повреждения эндотелия, а также переносчиком фактора свертывания крови VIII, защищающим его от протеолиза и тем самым продлевающим его период [2]. С учетом часто острого начала рано развившейся ИБС [3], а также ее часто неблагоприятного течения [4], мы предположили, что подобные события могут быть связаны с особенностями тромбообразования на первоначальном этапе, где ключевую роль играет ФВ.

В подавляющем большинстве исследований, в которых изучалась связь между ИБС и ФВ, проводилось измерение его уровня в плазме крови

с помощью иммуноферментного анализа [5-8]. Тем не менее подобный подход имеет выраженные ограничения. ИФА позволяет определить общее содержание в плазме крови ФВ, но не дает представления о том, каково содержание в ней его функционально активных и неактивных форм. Уровень ФВ может изменяться у одного и того же человека в разные периоды времени в широком диапазоне [9]. Уровень ФВ зависит от возраста, курения, сопутствующих заболеваний, а также от приема лекарственных препаратов [10, 11]. Наряду с этим можно предположить, что рецепторы тромбоцитов могут по-разному взаимодействовать с ФВ при одинаковом уровне в крови его функционально активных форм. Золотым стандартом измерения активности ФВ является анализ кофактора ристоцетина [12]. При проведении анализа используют антибиотик ристоцетин, который индуцирует связывание рецепторов GPIb тромбоцитов с доменом А1 ФВ. Таким образом, взаимодействие рецепторов GPIb тромбоцитов с ФВ происходит под действием химического агента, что радикально отличается от того, что происходит в человеческом организме [13]. Наряду с общепринятыми методами оценки

системы гемостаза в настоящее время осуществляется разработка и использование новых методов диагностики нарушений отдельных звеньев этого сложного, многокомпонентного процесса, в том числе направленных на оценку функциональной активности ФВ в условиях максимально приближенных к естественным [14-17].

Целью настоящего исследования явилось изучение у пациентов с ранним развитием ИБС адгезии тромбоцитов к коллагену, опосредованной взаимодействием их рецепторов GPIIb (единственный рецептор на неактивированном тромбоците с крайне высоким сродством к ФВ) с ФВ, с использованием оригинального микрофлюидного устройства [18, 19], позволяющего имитировать ток крови с заданной скоростью, создавая при этом скорость сдвига, характерную для стенотически измененных участков коронарных артерий.

Материалы и методы

В исследование были включены 84 пациента со стабильной ИБС, в том числе 62 мужчины в возрасте до 55 лет с манифестацией ИБС до 50 лет, а также 22 женщины в возрасте до 65 лет с манифестацией ИБС до 60 лет, у которых при коронароангиографии (КАГ) было выявлено гемодинамически значимое поражение коронарных артерий. В контрольную группу вошли 64 пациента (26 мужчин в возрасте до 55 лет и 38 женщин в возрасте до 65 лет), не имеющих клинических проявлений ИБС, у которых не было выявлено стенозирующего коронарного атеросклероза при КАГ и/или компьютерной томографической ангиографии коронарных артерий. Гемодинамически значимым поражением коронарных артерий считали поражение, приводящее к уменьшению диаметра просвета ствола левой коронарной артерии, или магистральной коронарной артерии (передней нисходящей, огибающей, правой), или ветви второго порядка диаметром >2 мм на 50% и более [20].

В исследование не включали пациентов с семейной гиперхолестеринемией, уровнем ХС-ЛНП >4,9 ммоль/л, нестабильной стенокардией, в первые 2 месяца после перенесенного инфаркта миокарда (ИМ), шунтирования или ангиопластики коронарных артерий, с сердечной недостаточностью III-IV функционального класса по NYHA, фракцией выброса левого желудочка <40%, постоянной формой фибрилляции/трепетания предсердий, стенозом устья аорты или левого атриовентрикулярного отверстия, наследственными и приобретенными коагулопатиями, злокачественными новообразованиями, клиническими и лабораторными признаками острого инфекционного заболевания в течение двух предшествующих месяцев.

У всех пациентов, включенных в исследование, оценивали наличие классических факторов риска ИБС (мужской пол, возраст, неблагоприятная наследственность в отношении ИБС, уровень

ХС-ЛВП <1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин, уровень ХС-ЛНП >3 ммоль/л, курение, ожирение, сахарный диабет и артериальная гипертензия) и сравнивали их между двумя исследуемыми группами. У пациентов с ранним возникновением ИБС оценивали ее первые проявления, данные КАГ и наличие в анамнезе операции стентирования и/или шунтирования коронарных артерий.

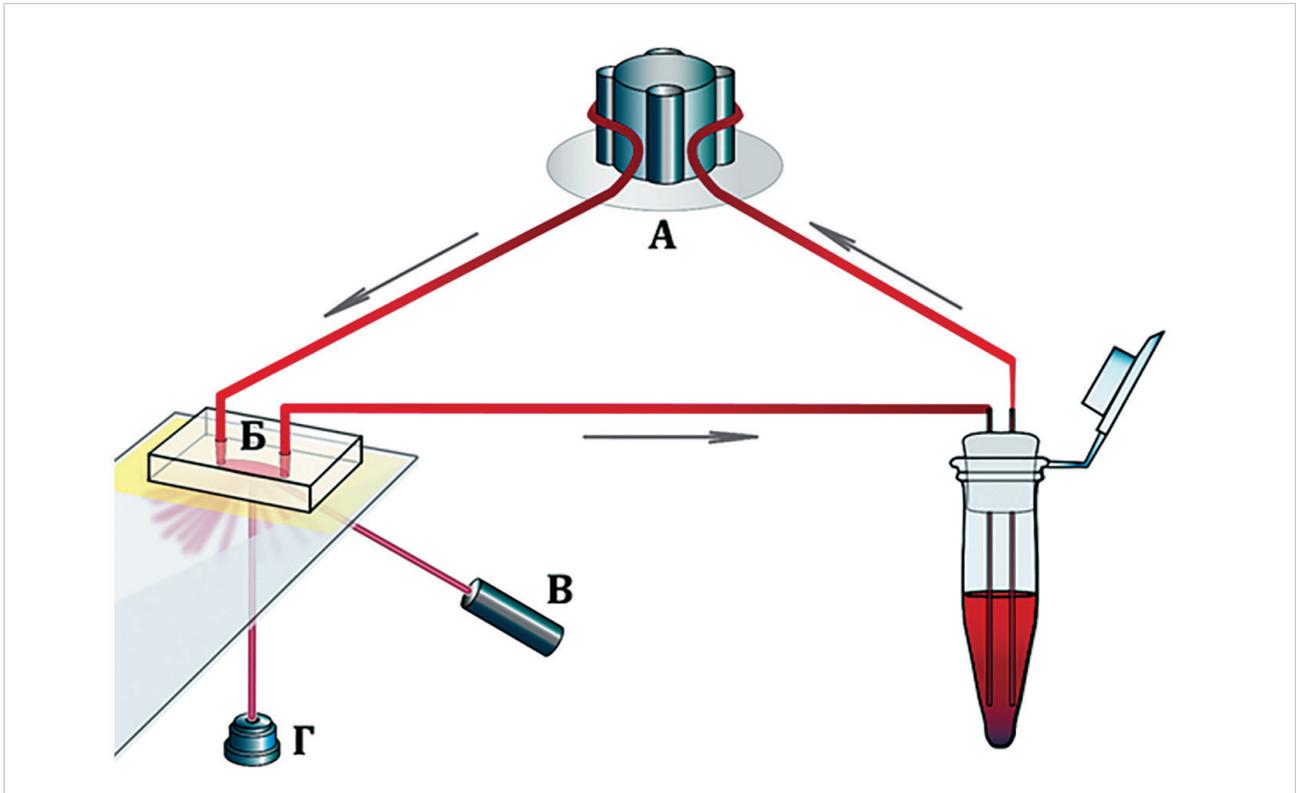
84 пациентам с ранним возникновением ИБС и 64 пациентам контрольной группы был измерен с помощью иммуноферментного анализа уровень ФВ в плазме крови и проведено его сопоставление в зависимости от наличия ИБС. Единицы измерения концентрации ФВ в плазме – % от нормального содержания (50-150%) [21]. Проведено сравнение уровня ФВ в плазме крови в зависимости от наличия основных факторов риска ИБС и приема антитромбоцитарной терапии (ацетилсалициловая кислота, клопидогрел, ацетилсалициловая кислота совместно с клопидогрелом, ацетилсалициловая кислота совместно с тикагрелором).

Логистический регрессионный анализ использовался для оценки независимости показателя «относительное снижение GPIIb-опосредованной адгезии тромбоцитов больше и равно медиане» и силы его связи с традиционными факторами риска (мужской пол, возраст, неблагоприятная наследственность в отношении ИБС, уровень ХС-ЛВП <1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин, уровень ХС-ЛНП >3 ммоль/л, курение, ожирение, сахарный диабет и артериальная гипертензия).

Измерение адгезии тромбоцитов к коллагеновой поверхности

В лаборатории клеточного гемостаза института экспериментальной кардиологии ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России создано микрофлюидное устройство для регистрации кинетики адгезии клеток крови к белковой поверхности в условиях контролируемого потока [18, 19]. Устройство состоит из проточной камеры с оптической подложкой с коллагеновым покрытием, перистальтического насоса, обеспечивающего движение крови через проточную камеру, источника лазерного излучения, фотодетектора и аналого-цифрового преобразователя, подключенного к компьютеру (рис. 1). Для покрытия оптической подложки слоем коллагена её поверхность инкубировали с раствором коллагена в концентрации 0,1 мг/мл в течение 2 часов при комнатной температуре. Стекланную поверхность оптической подложки перед покрытием коллагеном очищали 70% раствором этилового спирта. В работе использовали коллаген крысы типа I и фосфатно-солевой буфер производства фирмы Sigma (США). Растворы коллагена хранили при температуре +4 °С, мАТ – при –70 °С. Забор крови осуществляли из локтевой вены в вакуумные пробирки S-Monovette (Sarstedt, Германия), содержащие 100 мкМ D-фенилаланил-

Рисунок 1. Микрофлюидное устройство для регистрации кинетики адгезии тромбоцитов в условиях контролируемого потока. А. Перистальтический насос; Б. Проточная камера; В. Полупроводниковый лазер с длиной волны излучения $\lambda = 650$ нм; Г. Фотодетектор рассеянного лазерного излучения.



L-пролил-L-аргинин хлорметилкетона (Enzo, США). Все эксперименты проводились в течение 2 часов после забора крови.

На первом этапе эксперимента цельная кровь помещалась в микропробирку и подсоединялась к системе, обеспечивающей движение крови в проточной камере. Лазерное излучение направлялось на оптическую подложку проточной камеры, на которую был нанесен коллаген. Рассеянное лазерное излучение улавливалось фотодетектором. При включении устройства цельная кровь двигалась внутри проточной камеры с заданной скоростью. Скорость сдвига при этом составляла $\approx 1300 \text{ с}^{-1}$, что считают умеренным ее повышением, характерным для артерий с умеренным стенозированием просвета [22]. Форменные элементы крови, в первую очередь тромбоциты, проходя внутри проточной камеры, взаимодействовали с коллагеновым покрытием и адгезировали к нему. Это вызывало рассеяние лазерного излучения, которое нарастало по мере увеличения количества адгезированных клеток на поверхности подложки. Регистрируемое фотодетектором рассеянное лазерное излучение преобразовывалось в электрическое напряжение и измерялось в милливольтках (мВ). Таким образом, нарастание электрического напряжения на выходе фотодетектора отражало увеличение степени адгезии клеток к подложке с коллагеновым покрытием. Циркуляция крови в системе и регистрация сигнала

фотодетектора осуществлялась в течение 16 минут. Степень адгезии тромбоцитов определяли по 15-минутному значению сигнала фотодетектора по окончании 16-минутной циркуляции крови. Запись и обработка регистрируемого фотодетектором изменения интенсивности рассеянного света производились с помощью программного обеспечения L-Graph2 версия 2.35.16 (L-CARD, РФ), которое позволяла представить эти изменения в виде графика. На втором этапе эксперимента в новый образец цельной крови добавляли 10 мкг мАт кролика к рецепторам GPIb тромбоцитов человека фирмы ИМТЕК (Россия) и повторяли 16-минутную циркуляцию крови через новую проточную камеру. Результаты измерений сопоставляли между группами пациентов, а также определяли зависимость адгезии тромбоцитов от приема антитромбоцитарной терапии и уровней ФВ.

Статистический анализ

Собранные в ходе исследования количественные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, а также в виде медианы и квартилей (25-й и 75-й процентиля). Для проверки статистических гипотез о виде распределения использовали критерий Шапиро–Уилка W (Shapiro-Wilk's W test). Для сравнительного анализа данных пациентов обеих групп были использованы методы

непараметрической статистики: точный критерий Фишера и критерий χ^2 с поправкой Йетса – при сравнении качественных признаков, U-критерий Манна-Уитни – при сравнении количественных признаков в двух независимых группах, критерий Краскела-Уоллиса – при сравнении количественных признаков в трех и более независимых группах, критерий Вилкоксона – при сравнении количественных признаков в двух зависимых группах. Связь между величиной снижения опосредованной GPIIb адгезии тромбоцитов и наличием раннего развития ИБС, выраженную через отношение шансов, оценивали с помощью логистического регрессионного анализа. Величину уровня значимости p принимали равной 0,05. Все тесты были двусторонними. Статистический анализ выполнен при помощи программного обеспечения Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США) и SPSS Statistics v. 17.0 (SPSS Inc., США).

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России (протокол №262 от 30.11.20 г.) и выполнено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации 1964 г. У всех пациентов было получено информированное согласие в письменной форме.

Результаты

Пациенты с ранним развитием ИБС чаще были мужчинами, имели сахарный диабет, ХС-ЛВП <1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин, ХС-ЛНП >3 ммоль/л, чаще были курильщиками и злостными курильщиками, а также имели более высокое значение индекса курильщика (табл. 1). ИМ, как первое проявление ИБС у пациентов с ее ранним развитием, одинаково часто встречался

Таблица 1. Клиническая характеристика

	Пациенты с ранним развитием ИБС (n=84)	Контрольная группа (n=64)	p
Возраст, годы	54 (49; 55)	50,5 (44,5; 58)	0,1
Мужчины/женщины	62 (74%)/22 (26%)	26 (42%)/38 (58%)	<0,001
Неблагоприятная наследственность в отношении ИБС	23 (28%)	10 (16%)	0,1
ХС-ЛНП >3 ммоль/л	64 (76%)	40 (62%)	0,004
ХС-ЛВП <1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин	41 (50%)	14 (25%)	0,004
Курение	53 (63%)	24 (38%)	0,002
Активный курильщик	33 (62%)	14 (58%)	0,8
Бывший курильщик	20 (38%)	10 (42%)	0,8
Индекс курильщика	33 (25; 44)	17 (8; 22)	<0,001
Злостный курильщик	38 (72%)	5 (21%)	<0,001
Ожирение	44 (52%)	26 (41%)	0,1
Сахарный диабет	18 (21%)	5 (8%)	0,03
Артериальная гипертензия	75 (89%)	52 (81%)	0,2

Примечания. ИБС – ишемическая болезнь сердца; ХС-ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ХС-ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; индекс курильщика – среднее количество выкуриваемых сигарет в день, умноженное на количество лет курения и деленное на 20; злостный курильщик – индекс курильщика ≥ 25 .

как у мужчин, так и у женщин и регистрировался в 42,8% случаев. Стентирование коронарных артерий в анамнезе встречалось в 79,7%, шунтирование коронарных артерий – в 9,5% случаев. Гемодинамически значимое поражение передней нисходящей артерии, по данным КАГ, было выявлено

у 79,7%, огибающей артерии – у 56,2%, правой коронарной артерии – у 73,7%, основного ствола левой коронарной артерии – у 11,2% больных.

У пациентов с ранним развитием ИБС медиана плазменного уровня ФВ равнялась 111% (43; 354), у пациентов контрольной группы – 145% (33;

273), что было больше ($p=0,03$), чем у пациентов с ранним развитием ИБС. Уровень ФВ не зависел от возраста, пола, неблагоприятной наследственности в отношении ИБС, курения, ожирения, сахарного диабета, уровней ХС-ЛВП и ХС-ЛНП. Уровень ФВ был выше ($p=0,04$) у пациентов с артериальной гипертензией в сравнении с пациентами без нее и равнялся соответственно 129% (98; 183) и 110% (75; 132).

У пациентов с ранним развитием ИБС медиана 15-минутного значения адгезии тромбоцитов была 8,3 мВ (5,1; 13,4), после добавления в кровь мАТ

к рецепторам GPIIb тромбоцитов – 1,7 мВ (1,3; 3,2), что было на 77% (57,2; 84,6) меньше ($p < 0,001$), чем без блокирования рецепторов (рис. 2). У пациентов контрольной группы медиана 15-минутного значения адгезии тромбоцитов была 12,6 мВ (9,4; 16,7), после блокирования рецепторов GPIIb – 10,3 мВ (4,3; 14,8), что было на 29,5% (-6,9; 59,3) меньше ($p=0,03$), чем до блокирования рецепторов (рис. 3). У пациентов с ранним развитием ИБС по сравнению с группой контроля блокирование GPIIb тромбоцитов с помощью мАТ приводило к большему снижению адгезии тромбоцитов ($p < 0,001$) (табл. 2).

Рисунок 2. Кривые изменения интенсивности рассеянного лазерного излучения до и после блокирования мАТ рецепторов GPIIb тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС

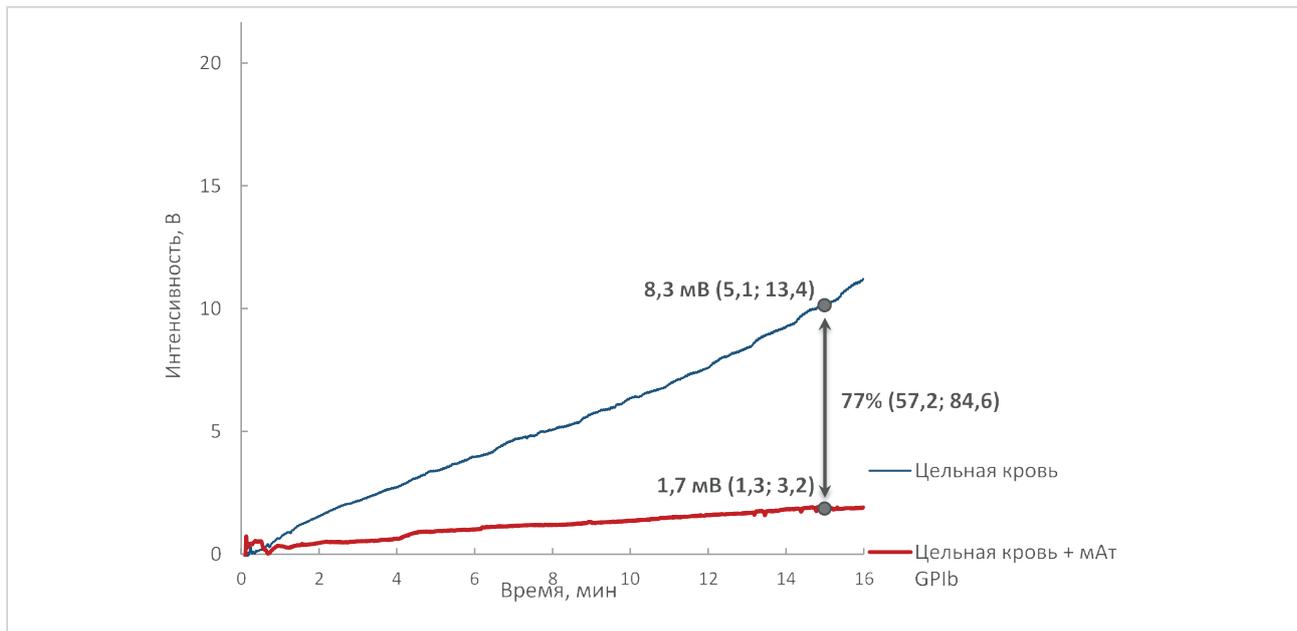


Рисунок 3. Кривые изменения интенсивности рассеянного лазерного излучения до и после блокирования мАТ рецепторов GPIIb тромбоцитов у пациентов контрольной группы

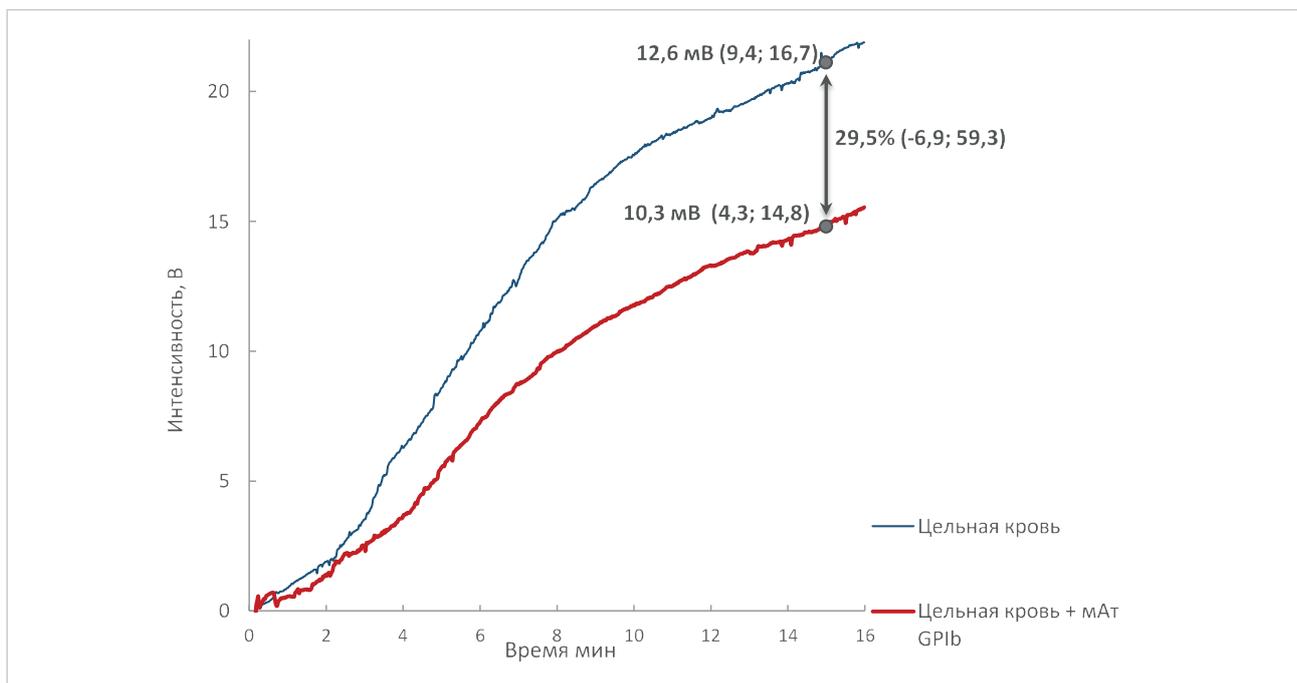


Таблица 2. Адгезия тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС и у пациентов контрольной группы

	Исходная адгезия тромбоцитов	Адгезия тромбоцитов после добавления мАт к GPIb	Относительное снижение адгезии тромбоцитов после добавления мАт к GPIb (Δ)	p
Пациенты с ранним развитием ИБС (n=84)	8,3 мВ (5,1; 13,4)	1,7 мВ (1,3; 3,2)	77% (57,2; 84,6)	<0,001
Контрольная группа (n=64)	12,6 мВ (9,4; 16,7)	10,3 мВ (4,3; 14,8)	29,5% (-6,9; 59,3)	<0,001

Примечания. ИБС – ишемическая болезнь сердца; мВ – милливольт; мАт – моноклональные антитела; GPIb – гликопротеин Ib; Δ – изменение адгезии тромбоцитов после блокирования мАт рецепторов к GPIb тромбоцитов в сравнении с ее исходным значением; p – сравнение двух зависимых переменных (критерий Вилкоксона).

Медиана снижения адгезии тромбоцитов при блокировании рецепторов GPIb тромбоцитов у всех включенных в исследование пациентов была равна 62% (50,5; 68,3). Среди пациентов с ранним развитием ИБС у 29,7% больных снижение адгезии было меньше медианы, у 70,3% пациентов – больше или равно медиане (табл. 3). В то время как среди пациентов контрольной группы у 78,1%

Таблица 3. Количество пациентов в исследуемых группах в зависимости от снижения адгезии тромбоцитов выше и ниже медианы

	Снижение адгезии тромбоцитов после добавления мАт к GPIb		p
	<62%	≥62%	
Пациенты с ранним развитием ИБС (n=84)	25 (29,7%)	59 (70,3%)	<0,001
Контрольная группа (n=64)	50 (78,1%)	14 (21,9%)	<0,001

Примечания. ИБС – ишемическая болезнь сердца; мАт – моноклональные антитела; GPIb – гликопротеин Ib; p – точный критерий Фишера.

участников исследования снижение адгезии было меньше медианы, у 21,9% пациентов – больше или равно медиане.

При сравнении исходных значений адгезии тромбоцитов, значений адгезии тромбоцитов после

добавления мАт к GPIb и значений относительного снижения адгезии тромбоцитов после добавления мАт к GPIb у всей исследуемой когорты пациентов в зависимости от уровней ФВ, разделенных на квартили, разницы выявлено не было (табл. 4).

Таблица 4. Зависимость адгезии тромбоцитов у всей исследуемой когорты по квартилям уровня ФВ

	Q1	Q2	Q3	Q4	p
Исходная адгезия тромбоцитов	10,6 мВ (6,2; 14,5)	8,4 мВ (5,1; 14)	10,8 мВ (7,6; 17,4)	11,2 мВ (8,1; 15)	0,4
Адгезия тромбоцитов после добавления мАт к GPIb	2,8 мВ (1,3; 9,1)	2,1 мВ (1,3; 7,3)	4,1 мВ (1,9; 10,4)	3,8 мВ (1,8; 11,8)	0,1
Относительное снижение адгезии тромбоцитов после добавления мАт к GPIb (Δ)	58,8% (61,8; 79,7)	67,5% (27,2; 80,7)	47,5% (21,9; 78,1)	61,8% (21; 79,3)	0,6

Примечания. Q – квартиль; ФВ – фактор Виллебранда; мАт – моноклональные антитела; GPIb – гликопротеин Ib; мВ – милливольт; p – сравнение трех и более независимых групп (критерий Краскела-Уоллиса).

Различий в выраженности адгезии тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС в зависимости от приема антитромбоцитарной терапии (ацетилсалициловая кислота, клопидогрел, ацетилсалициловая кислота совместно с клопидогрелом, ацетилсалициловая кислота совместно с тикагре-

лором) до и после блокирования GPIIb рецепторов тромбоцитов не было выявлено (табл. 5).

При логистическом регрессионном анализе относительное снижение GPIIb-опосредованной адгезии тромбоцитов больше и равное медиане, мужской пол, сахарный диабет, значения ХС-ЛВП

Таблица 5. Адгезия тромбоцитов в зависимости от приема антитромбоцитарной терапии у пациентов с ранним развитием ИБС

Антитромбоцитарная терапия	Количество пациентов	Исходная адгезия, мВ	Адгезия после добавления мАт к GPIIb, мВ	Δ, %
Без терапии	6	12,7 (7,4; 13,5)	2,6 (1; 3,8)	75,8 (60,7; 83,2)
АСК	19	11,2 (8,3; 14,4)	3 (1,5; 9,2)	61,5 (37,2; 82,1)
Клопидогрел	9	5,9 (4,3; 7,5)	1,7 (0,6; 2,9)	73,2 (62,1; 81,5)
АСК + клопидогрел	41	7 (4,7; 13,4)	1,5 (1,2; 2,8)	77,4 (60,3; 84,6)
АСК + тикагрелор	9	8,8 (7,6; 15)	1,6 (1,3; 1,9)	81,7 (76,9; 88,3)
р	-	0,1	0,1	0,1

Примечания. ИБС – ишемическая болезнь сердца; АСК – ацетилсалициловая кислота; мВ – милливольт; мАт – моноклональные антитела; GPIIb – гликопротеин IIb; Δ – изменение адгезии тромбоцитов после блокирования мАт рецепторов к GPIIb тромбоцитов в сравнении с ее исходным значением; р – сравнение трех и более независимых групп (критерий Краскела-Уоллиса). Пациенты принимали АСК и клопидогрел в суточной дозе равной соответственно 100 и 75 мг. У 6 пациентов забор крови осуществляли при поступлении, до назначения антитромбоцитарной терапии.

<1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин, курение и возраст были независимо связаны с ранним развитием ИБС (табл. 6).

Для проведения многофакторного анализа была построена логистическая регрессионная модель.

В модель вошли переменные, продемонстрировавшие независимую связь с ранним развитием ИБС в однофакторном анализе. Согласно построенной модели относительное снижение GPIIb-опосредованной адгезии тромбоцитов больше

Таблица 6. Однофакторный логистический регрессионный анализ взаимосвязи между вероятностью раннего развития ИБС и отдельными независимыми переменными

Переменная	Отношение шансов	95% доверительный интервал	р
Относительное снижение GPIIb-опосредованной адгезии тромбоцитов больше и равное медиане	8,4	3,9-7,9	<0,001
Мужской пол	4,1	2-8,2	<0,001
Сахарный диабет	3,2	1,1-9,2	0,02
ХС-ЛВП <1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин	3	1,4-6,3	0,003
Курение	2,8	1,4-5,6	0,002
Возраст	1,4	1,1-1,9	0,004
Неблагоприятная наследственность в отношении ИБС	2	0,9-4,7	0,07
Артериальная гипертензия	1,9	0,7-4,9	0,1
ХС-ЛНП >3 ммоль/л	1,5	0,7-3	0,3
Ожирение	1,5	0,7-2,8	0,2

Примечания. ИБС – ишемическая болезнь сердца; GPIIb – гликопротеин IIb; ХС-ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности.

и равное медиане сохраняло связь с ранним развитием ИБС (ОШ 5,2; 95% ДИ: 2,1-12,6; $p < 0,001$) (табл. 7).

Обсуждение

Исследования часто показывают прямую связь между уровнем ФВ и риском неблагоприятных

сердечно-сосудистых событий у пациентов с ИБС, в то время как у здоровых людей такой связи не наблюдается [10, 23, 24]. Например, проспективное исследование ESCAT показало, что пациенты со стабильной ИБС, у которых возник ИМ или внезапная сердечная смерть за 2-летний период наблюдения, изначально имели выше уровень ФВ в крови, чем пациенты без этих событий. Относи-

Таблица 7. Многофакторный логистический регрессионный анализ взаимосвязи между вероятностью раннего развития ИБС и переменными с наивысшим уровнем значимости

Переменная	Отношение шансов	95% доверительный интервал	p
Относительное снижение GPIIb-опосредованной адгезии тромбоцитов больше и равное медиане	5,2	2,1-12,6	<0,001
Мужской пол	3,1	1,1-8,6	0,02
Возраст	1,8	1,2-2,7	0,002
Сахарный диабет	2,5	1,7-9,3	0,1
Курение	2,1	0,8-5,4	0,09
ХС-ЛВП <1 ммоль/л для мужчин и <1,2 ммоль/л для женщин	2,1	0,8-5,4	0,1

Примечания. ИБС – ишемическая болезнь сердца; GPIIb – гликопротеин IIb; ХС-ЛНП – холестерин липопротеидов низкой плотности; ХС-ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности.

тельный риск возникновения неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов со стабильной ИБС верхнего квантиля в зависимости от уровня ФВ был выше на 85%, чем у пациентов нижнего квантиля [25]. В исследованиях было показано наличие прямой связи между уровнем ФВ в крови и возникновением неблагоприятных сердечно-сосудистых событий у пациентов, перенесших ИМ [10, 23]. В отличие от пациентов с ИБС, у лиц, не имеющих этого заболевания, уровень ФВ является слабым независимым предиктором возникновения ИБС [26].

Во многих исследованиях, которые изучали влияние ФВ на развитие и течение ИБС, уровень ФВ в плазме крови измерялся при помощи иммуноферментного анализа [5-8]. Согласно результатам настоящего исследования более высокие значения уровней ФВ не были связаны с рано возникшей ИБС. Также уровень ФВ в крови не был связан с адгезией тромбоцитов до и после блокирования их GPIIb рецепторов. Это подтверждает, что не уровни ФВ, а его функциональное состояние критически важно на начальном этапе формирования артериального тромба.

Наша гипотеза была подтверждена результатами текущего исследования. Циркуляция крови в проточной камере сопровождалась взаимодействием ФВ с коллагеновой подложкой, что приводило к адгезии тромбоцитов к ней и, как следствие этого, увеличивало интенсивность рассеивания,

направленного на поверхность камеры лазерного излучения. Добавление мАт к рецепторам GPIIb тромбоцитов в образцы циркулирующей крови приводило к снижению адгезии и уменьшению рассеивания лазерного излучения. Мы обнаружили значительное расхождение в выраженности ингибирования адгезии после добавления мАт к рецепторам GPIIb тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС и у пациентов без этого заболевания. У пациентов с ранним развитием ИБС наблюдалось относительное снижение адгезии тромбоцитов с медианой в 77% после блокирования рецепторов GPIIb, тогда как у пациентов без ИБС всего 29,5% ($p < 0,001$). Исходя из этого, можно предположить, что «вклад» взаимодействия ФВ с рецепторами GPIIb тромбоцитов в адгезию тромбоцитов у пациентов с ранним развитием ИБС выше, чем у пациентов без ИБС. Логистический регрессионный анализ показал, что с поправкой на традиционные факторы риска ИБС, снижение адгезии тромбоцитов $\geq 62\%$ после блокирования рецепторов GPIIb увеличивало вероятность наличия раннего развития ИБС (ОШ 5,2; 95% ДИ: 2,1-12,6; $p < 0,001$). Следует также отметить, что прием анти-тромбоцитарных препаратов (ацетилсалициловой кислоты, клопидогрела, тикагрелора) пациентами с ранним развитием ИБС не оказывал влияния на выраженность снижения адгезии тромбоцитов после блокирования их рецепторов GPIIb. Подобный факт позволяет осуществлять оценку динамики

адгезии тромбоцитов после блокирования рецепторов GPIIb без учета вышеупомянутых антитромбоцитарных препаратов.

Заключение

Более выраженное снижение при повышенной скорости сдвига адгезии тромбоцитов в ответ на блокирование взаимодействия их рецепторов GPIIb с ФВ у пациентов с ранним развитием ИБС в сравнении с пациентами без этого заболевания указывает на возможную роль «чрезмерного» взаимодействия ФВ с тромбоцитами в патогенезе раннего развития ИБС.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ #21-15-00029

Список литературы / References

1. Barbarash O, Karpov Yu, Kashtalap V, Boshchenko A, Ruda M, Akchurin R, et al. Stable ischemic heart disease. Clinical guidelines 2020. *Russ J Cardiol.* 2020;11:201-250. In Russian. (Барбараш О., Карпов Ю., Каушалап В., Бошченко А., Руда М., Акчурин Р. и др. Стабильная ишемическая болезнь сердца. Клинические рекомендации 2020. Российский кардиологический журнал. 2020;11:201-250). <https://doi.org/10.15829/291560-4071-2020-4076>.
2. Pendu R, Terraube V, Christophe OD, Gabmberg CG, de Groot PG, Lenting PJ, et al. P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood.* 2006;108(12):3746-3752. doi: 10.1182/blood-2006-03-010322.
3. Zeitouni M, Clare RM, Chiswell K, Abdulrahim J, Shab N, Pagidipati NP, et al. Risk Factor Burden and Long-Term Prognosis of Patients With Premature Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc.* 2020;9(24):e017712. doi: 10.1161/jaha.120.017712.
4. Awad-Elkarim AA, Bagger JP, Albers CJ, Skinner JS, Adams PC, Hall RJ. A prospective study of long term prognosis in young myocardial infarction survivors: the prognostic value of angiography and exercise testing. *Heart.* 2003;89(8):843-847. doi: 10.1136/heart.89.8.843.
5. Rutten B, Maseri A, Cianflone D, Laricchia A, Cristell NA, Durante A, et al. Plasma levels of active Von Willebrand factor are increased in patients with first ST-segment elevation myocardial infarction: a multicenter and multiethnic study. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* 2015;4(1):64-74. doi: 10.1177/2048872614534388.
6. Li Y, Li L, Dong F, Guo L, Hou Y, Hu H, et al. Plasma von Willebrand factor level is transiently elevated in a rat model of acute myocardial infarction. *Exp Ther Med.* 2015;10(5):1743-1749. doi: 10.3892/etm.2015.2721.
7. Chion CK, Doggen CJ, Crawley JT, Lane DA, Rosendaal FR. ADAMTS13 and von Willebrand factor and the risk of myocardial infarction in men. *Blood.* 2007;109(5):1998-2000. doi: 10.1182/blood-2006-07-038166.
8. Willeit P, Thompson A, Aspelund T, Rumley A, Eiriksdottir G, Lowe G, et al. Hemostatic factors and risk of coronary heart disease in general populations: new prospective study and updated meta-analyses. *PLoS One.* 2013;8(2):e55175. doi: 10.1371/journal.pone.0055175.
9. Roberts J, Flood V. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol.* 2015;37:11-17. doi: 10.1111/ijlh.12345.
10. Ray KK, Morrow DA, Gibson CM, Murphy S, Antman EM, Braunwald E. Predictors of the rise in vWF after ST elevation myocardial infarction: implications for treatment strategies and clinical outcome: An ENTIRE-TIMI 23 substudy. *Eur Heart J.* 2005;26(5):440-446. doi: 10.1093/eurheartj/ehi104.
11. Xu AG, Xu RM, Lu CQ, Yao MY, Zhao W, Fu X, et al. Correlation of von Willebrand factor gene polymorphism and coronary heart disease. *Mol Med Rep.* 2012;6(5):1107-1110. doi: 10.3892/mmr.2012.1037.
12. Durner K. *Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen; [Taschenrechnerbuch].* 2009: Georg Thieme Verlag.
13. Budde U, Pieconka A, Will K, Schneppenheim R. Laboratory testing for von Willebrand disease: contribution of multimer analysis to diagnosis and classification. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32(5):514-521. doi: 10.1055/s-2006-947866.
14. Zheng Y, Chen J, Lypez JA. Flow-driven assembly of VWF fibres and webs in in vitro microvessels. *Nat Commun.* 2015;6:7858. doi: 10.1038/ncomms8858.
15. Kim DA, Ashworth KJ, Di Paola J, Ku DN. Platelet α -granules are required for occlusive high-shear-rate thrombosis. *Blood Adv.* 2020;4(14):3258-3267. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002117.
16. Schoeman RM, Lehmann M, Neeves KB. Flow chamber and microfluidic approaches for measuring thrombus formation in genetic bleeding disorders. *Platelets.* 2017;28(5):463-471. doi: 10.1080/09537104.2017.1306042.
17. Brazilek RJ, Tovar-Lopez FJ, Wong AKT, Tran H, Davis AS, McFadyen JD, et al. Application of a strain rate gradient microfluidic device to von Willebrand's disease screening. *Lab Chip.* 2017;17(15):2595-2608. doi: 10.1039/c7lc00498b.
18. Avtaeva Yu, Melnikov I, Gabbasov Z. Real-time registration of platelet adhesion on a fibrinogen coating immobilized on an optical substrate under flow conditions. *Cellular technologies in biology and medicine.* 2018;1:48-52. In Russian. (Автаева Ю., Мельников И., Габбасов З. Регистрация в реальном времени адгезии тромбоцитов на иммобилизованном на оптической подложке фибриногеном покрытии в условиях потока. *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2018;1:48-52).

19. Gabbasov ZA, Avtaeva YN, Melnikov IS, Okbota SD, Caprnda M, Mozos I, et al. Kinetics of platelet adhesion to a fibrinogen-coated surface in whole blood under flow conditions. *J Clin Lab Anal.* 2021;35(9):e23939. doi: 10.1002/jcla.23939.
20. Neeland IJ, Patel RS, Eshtebardi P, Dbawan S, McDaniel MC, Rab ST, et al. Coronary angiographic scoring systems: an evaluation of their equivalence and validity. *Am Heart J.* 2012;164(4):547-552.e1. doi: 10.1016/j.ahj.2012.07.007.
21. Yanushevskaya E, Barkevich E, Khaspekova S, Naimusbin J, Vlasik T, Likhacheva E, et al. Determination of von Willebrand factor by ELISA using monoclonal antibodies. Application of the method for the diagnosis of von Willebrand's disease. *Hematology and Transfusiology.* 2005;50(2):20-25. In Russian. (Янушевская Е, Баркевич Е, Хаспекова С, Наймушин Я, Власик Т, Лихачева Е. и др. Определение фактора Виллебранда с помощью иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител. Применение метода для диагностики болезни Виллебранда. *Гематология и трансфузиология.* 2005;50(2):20-25).
22. Rana A, Westein E, Niego B, Hagemeyer CE. Shear-Dependent Platelet Aggregation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Front Cardiovasc Med.* 2019;6:141. doi: 10.3389/fcvm.2019.00141.
23. Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. von Willebrand factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J.* 1991;66(5):351-355. doi: 10.1136/brt.66.5.351.
24. Rumley A, Lowe GD, Sweetnam PM, Yarnell JW, Ford RP. Factor VIII, von Willebrand factor and the risk of major ischaemic heart disease in the Caerphilly Heart Study. *Br J Haematol.* 1999;105(1):110-116.
25. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995;332(10):635-641. doi: 10.1056/nejm199503093321003.
26. Viscber UM. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. *J Thromb Haemost.* 2006;4(6):1186-1193. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01949.x.