

УДК 577.175.72

ПОВЫШЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ К ДЕЙСТВИЮ ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА*

© 2019 N. Gligorijevic**, D. Robajac, O. Nedic

*Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), University of Belgrade,
11080 Belgrade, Serbia; E-mail: nikolag@inep.co.rs*

Поступила в редакцию 03.04.2019

После доработки 08.06.2019

Принята к публикации 24.06.2019

Для сахарного диабета характерно усиление процесса активации тромбоцитов. Этот феномен обусловлен действием многих факторов, в том числе изменениями уровня экспрессии мембранных белков. Целью настоящей работы было изучение чувствительности тромбоцитов человека к действию системы инсулиноподобного фактора роста (IGF) у больных со слабо контролируемым диабетом 2-го типа (DM2). Для проведения анализа связывания лиганда и определения уровня экспрессии рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и рецептора инсулина (IR) с помощью метода вестерн-блоттинга использовали IGF-1, радиоактивно меченый ^{125}I . Агрегацию тромбоцитов в присутствии IGF-1 оценивали с помощью метода оценки агрегации тромбоцитов в планшетах (plate aggregometry assay). В результате проведенной работы было показано увеличение количества связанного с тромбоцитами IGF-1 и повышение уровня экспрессии IGF-1R в тромбоцитах, полученных от больных сахарным диабетом 2-го типа по сравнению с тромбоцитами здоровых людей. Связывание инсулина и уровень экспрессии инсулинового рецептора, в общем, были ниже в группе с сахарным диабетом 2-го типа. Однако эти различия не были статистически достоверными. Усиление процесса активации тромбоцитов, индуцированного тромбином, под влиянием IGF-1 было обнаружено в обеих группах, но этот эффект был более выражен у больных сахарным диабетом 2-го типа. Начальная скорость активации тромбоцитов в присутствии IGF-1 положительно коррелировала с концентрацией гликированного гемоглобина (HbA1c). Таким образом, тромбоциты, выделенные из крови больных сахарным диабетом 2-го типа, имеют повышенный уровень экспрессии субъединиц IGF-1R, что может способствовать более высокой чувствительности тромбоцитов к IGF-1, за счет увеличения скорости их активации в процессе агрегации, индуцированной тромбином. Однако необходимы дальнейшие эксперименты для изучения потенциальной роли IGF-1 в тромботических осложнениях, сопровождающих диабет.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тромбоциты крови, диабет 2-го типа, гемостаз, инсулиноподобный фактор роста 1, агрегация тромбоцитов.

DOI: 10.1134/S0320972519100129

При сахарном диабете (DM) наблюдается гиперкоагуляционное состояние, и пациенты, страдающие от этой болезни, отличаются повышенным риском образования тромбов [1]. Примерно 80% случаев смерти людей с сахарным диабетом связаны с тромбозом. При DM повышается концентрация многих факторов свертыва-

ния крови, таких как фибриноген, тромбин, тканевые факторы, факторы коагуляции VII, VIII, XI, XII, калликреин и фактор Виллебранда [2, 3]. У больных DM фибриноген рассматривается как тромбообразующий фактор, так как из него образуется фибрин, который более устойчив к лизису из-за сниженной проницаемости тромба, пониженного образования плазмينا и повышенного связывания ингибитора активатора плазминогена 1 (plasminogen activator inhibitor-1) [4–6].

В общем, при сахарном диабете наблюдается повышенная реактивность тромбоцитов, обусловленная несколькими факторами: 1) более высокой мобилизацией ионов Ca^{2+} , 2) гликированием мембраны тромбоцитов, что может приводить к повышенной экспрессии отдельных рецепторов, включая Р-селектин, гликопротеин Ib-IX и ре-

Принятые сокращения: IGF – инсулиноподобный фактор роста (insulin like growth factor); DM – сахарный диабет; DM2 – диабет 2-го типа; IGF-1R – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1; IR – рецептор инсулина; HbA1c – гликированный гемоглобин.

* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 84, вып. 10, 2019.

** Адресат для корреспонденции.

цептор фибриногена IIb/IIIa [7, 8] и 3) снижении концентрации cAMP [9]. Также недавно было показано, что у больных сахарным диабетом 2-го типа (DM2) наблюдается повышенный уровень активированного рецептора P2Y₁₂ [10]. Все эти изменения приводят к повышению чувствительности тромбоцитов к различным агонистам, таких как тромбин, ADP и коллаген. Кроме того, возникает устойчивость к действию аспирина [11].

На сегодня результаты по влиянию инсулина на функционирование тромбоцитов довольно противоречивы. Одни исследователи выявили инсулиноподобные ингибирующие эффекты, в то время как другие не обнаружили изменений в подверженности тромбоцитов коагуляции после действия инсулина [12, 13]. Инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) является гомологичным инсулину белком, который действует в основном как анаболический гормон, участвующий в процессах роста, дифференцировки и миграции клеток [14]. Этот белок также принимает участие в гемостазе. Он способен стимулировать заживление ран, сам по себе или совместно с другими молекулами. Предполагается, что нарушение взаимодействия этого белка с его рецептором приводит к замедлению заживления кожи у больных сахарным диабетом [15]. На поверхности тромбоцитов располагаются рецептор инсулина (IR), рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1R) и гибридный рецептор обоих белков (IGF-1R/IR) [16]. IGF-1, предпочтительно, связывается со своим специфичным рецептором (IGF-1R) и с гибридным рецептором (IGF-1R/IR) [17]. В одиночку IGF-1 не способен активировать тромбоциты, однако он усиливает их активацию в присутствии различных активаторов [18, 19]. Сами тромбоциты содержат IGF-1 в α -гранулах, которые высвобождаются в процессе активации тромбоцитов, что приводит к повышению локальной концентрации этого фактора роста в месте повреждения ткани.

Поскольку все предыдущие исследования, в которых изучалось влияние IGF-1 на тромбоциты в популяции, подверженной сахарному диабету, проводились только на лабораторных животных, у которых искусственно вызвали DM [20, 21], представляется актуальным исследовать влияние IGF-1 на тромбоциты, выделенные из крови больных со слабо контролируемым сахарным диабетом 2-го типа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Все реагенты были приобретены в компании «Sigma» (США), за исключением тех реактивов, о которых сказано отдельно.

БСА, использованный для работы с суспензией тромбоцитов, применяется при проведении радиоиммунологических определений (RIA grade), и он не содержит примесей инсулина. Препарат IGF-1 был получен от компании «GroPer Bioreagents» (Австралия), инсулин был получен от компании «Novo Nordisk» (Дания).

Выделение тромбоцитов из образцов крови больных. Тромбоциты выделяли из образцов цельной крови взрослых больных со слабо контролируемым DM2 ($n = 20$, 12 мужчин и 8 женщин в возрасте 35–79 лет, содержание гликированного гемоглобина (HbA_{1c}): 7,5–10,1%) и здоровых людей ($n = 20$, 9 мужчин и 11 женщин в возрасте 30–80 лет, содержание HbA_{1c}: 4,5–5,5%). Больным были поставлены диагнозы, и они наблюдались в клинических центрах Сербии. После забора проб крови (пробирки, используемые в данной работе, содержали антикоагулянт — лимонную кислоту) каждый образец крови мягко перемешивали и затем центрифугировали при 200 g при комнатной температуре в течение 20 мин, чтобы получить плазму крови, обогащенную тромбоцитами. Эту плазму затем переносили в новые пробирки и добавляли равный объем буфера HEP (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,8 mM HEPES, 5 mM ЭДТА, pH 7,4) и подвергали мягкому перемешиванию. Затем полученную суспензию клеток центрифугировали при 100 g в течение 15 мин, чтобы осадить эритроциты и лейкоциты. Полученную суспензию тромбоцитов далее центрифугировали при 800 g в течение 20 мин. Выпавшие при этом в осадок тромбоциты суспендировали в буфере Tyrode (134 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2,9 mM KCl, 0,34 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,4). Чистоту препарата тромбоцитов и их количество определяли с использованием счетчика клеток Mythic 18 («Orphee», Швейцария). Для проведения дальнейших экспериментов использовали суспензию тромбоцитов в концентрации $(1-2) \times 10^8$ клеток/мл. Итоговая суспензия также содержала 5 mM глюкозы и 0,25% (w/v) БСА. Каждый образец подвергался изучению как описано ниже.

Анализ связывания IGF-1 и инсулина с изолированными тромбоцитами. Суспензию тромбоцитов ($0,5 \times 10^8$ клеток/0,5 мл) инкубировали с мечеными [¹²⁵I] IGF-1 или инсулином (5×10^4 cpm, конечная концентрация белков 45 пмоль, специфическая активность обоих лигандов 36 МБк/нмоль или $2,22 \times 10^9$ cpm/нмоль) в течение ночи при комнатной температуре. Препараты [¹²⁵I]-меченый IGF-1 и [¹²⁵I]-меченый инсулин получали с помощью метода, в котором используется хлорамин Т [22]. Вкратце, 4 мкг IGF-1 или инсулина в 0,2 мл 0,05 М фос-

фатного буфера, pH 7,4 инкубировали при постоянном перемешивании с 1 мКи Na^{125}I («Izotop», Венгрия) и 10 мкл хлорамина Т (1 мг/мл) в течение 60 с. Реакцию прекращали, добавляя 50 мкл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 мг/мл). Меченый белок освобождали от избытка Na^{125}I с помощью гелефильтрации на колонке Sephadex G-50 (30×1 см). Все эксперименты проводили не позднее 2-х недель после мечения белка, чтобы избежать существенного влияния на результаты процесса разрушения лиганда. В контрольном эксперименте смешивали все реагенты без добавления тромбоцитов согласно методу Hunter и Hers [16]. После завершения инкубации суспензию тромбоцитов центрифугировали при 800 g в течение 20 мин. Полученный супернатант удаляли, в осадках, содержащих тромбоциты, измеряли радиоактивность на гамма-счетчике Genesys Gamma 1 («Laboratory Technologies», США) [16].

Определение рецепторов IGF-1 и инсулина с помощью метода вестерн-блоттинга. После измерения радиоактивности в осадке, содержащем тромбоциты, как это было описано выше, каждый образец смешивали с буфером для образцов, используемым при проведении электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии восстанавливающих агентов и додецилсульфата натрия (SDS). Белки солибилизованных тромбоцитов подвергали электрофорезу в восстанавливающих условиях в 10%-ном полиакриламидном геле (SDS-PAGE) в соответствии с методом, описанным Laemmli [23]. Затем разделенные белки переносили из геля на нитроцеллюлозную мембрану. Для обнаружения рецептора IGF-1 и инсулинового рецептора сначала использовали моноклональные мышиные антитела против рецептора IGF-1 («Santa Cruz Biotechnology», США) и рецептора инсулина («GroPep Bioreagents», Австралия). Затем добавляли биотинилированные вторые антитела против мышиных IgG («Vector», США) и авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена («Vector», США). Визуализацию прореагировавших с антителами белков осуществляли с помощью радиографии с использованием реагента ECL (enhanced chemiluminescence, усиленная хемотрюминесценция) («Pierce Biotechnology», США).

Анализ агрегации тромбоцитов. Влияние инсулиноподобного фактора роста 1 на скорость агрегации тромбоцитов изучали с помощью ридера Victor³V с высокоскоростным орбитальным шейкером, на котором можно определять различные метки («PerkinElmer», США), используя 96-луночные микропланшеты и тромбин в качестве активатора, в соответствии с методом, опубликованным ранее [24]. Тромбоциты

($0,2 \times 10^8$ клеток/0,1 мл в буфере Tyrode, дополненном 2 mM CaCl_2) инкубировали с IGF-1 (100 нМ) при комнатной температуре в течение 5 мин. В контрольных экспериментах (для каждого образца отдельно) смешивали вместе все необходимые реагенты без добавления IGF-1. Затем измеряли исходное значение оптической плотности суспензии при 405 нм, и в каждую ячейку как можно быстрее добавляли тромбин до конечной концентрации 1 IU/мл. Сразу после добавления тромбина микропланшет помещали на ридер Victor³V и регистрировали оптическую плотность при 405 нм с интервалами, равными 1 мин, в течение 9 мин (время от времени покачивая микропланшет). Начальную скорость агрегации тромбоцитов рассчитывали по линейной части кривой, описывающей процесс агрегации.

Анализ полученных данных. Некоторые полученные результаты не показывали нормальное распределение. Поэтому все полученные данные представлены в виде медиан с персентилем (2,5-й–97,5-й). Денситометрический анализ белковых полос на нитроцеллюлозных мембранах проводили с использованием программы Image Master TotalLab software, версия 2.01 («Amersham BioSciences», Великобритания). Полученные данные денситометрии нормализовали путем деления интенсивности окрашенных с помощью антител полос на интенсивность белковых полос, определяемую при их окрашивании с помощью красителя Ponceau S. Во всех экспериментах статистически достоверные различия между группами определяли с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Корреляционный анализ осуществляли с помощью теста Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ связывания IGF-1 и инсулина с изолированными тромбоцитами и определение содержания IGF-1R и IR. В нашей работе показано, что как [^{125}I]-меченый IGF-1, так и [^{125}I]-меченый инсулин связываются с изолированными тромбоцитами. В то же время гораздо больше [^{125}I]-меченый IGF-1 связывается с тромбоцитами, полученными от больных с сахарным диабетом 2-го типа, чем с тромбоцитами от здоровых людей (рис. 1, а). На основании данных, полученных при измерении специфической активности радиоактивно меченого IGF-1 ($2,22 \times 10^9$ cpm/нмоль), было определено количество IGF-1, которое связалось с поверхностью тромбоцитов. Оно оказалось равным 0,71 (0,516–0,943) фмоль у здоровых индивидов и 1,69 (0,326–3,073) фмоль

у больных DM2. Иммуноблоттинг белков тромбоцитов и денситометрический анализ подтвердили значительные различия экспрессии рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 у больных DM2 по сравнению с контрольной группой людей (рис. 1, б), обусловленные повышением связывания лиганда из-за увеличения количества рецепторов на мембране тромбоцитов. Репрезентативный иммуноблот с пятью образцами из

каждой исследованной группы показан на рис. 1, б (результаты окрашивания белковых полос в тех же образцах красителем Ponceau S представлены на рис. S1 Приложения; иммуноблоты всех образцов представлены на рис. S2 Приложения). Статистический анализ всех образцов показан ниже ($n = 20$ в каждой группе). Результаты отражают широкий разброс значений в случае группы больных сахарным диабетом 2-го типа.

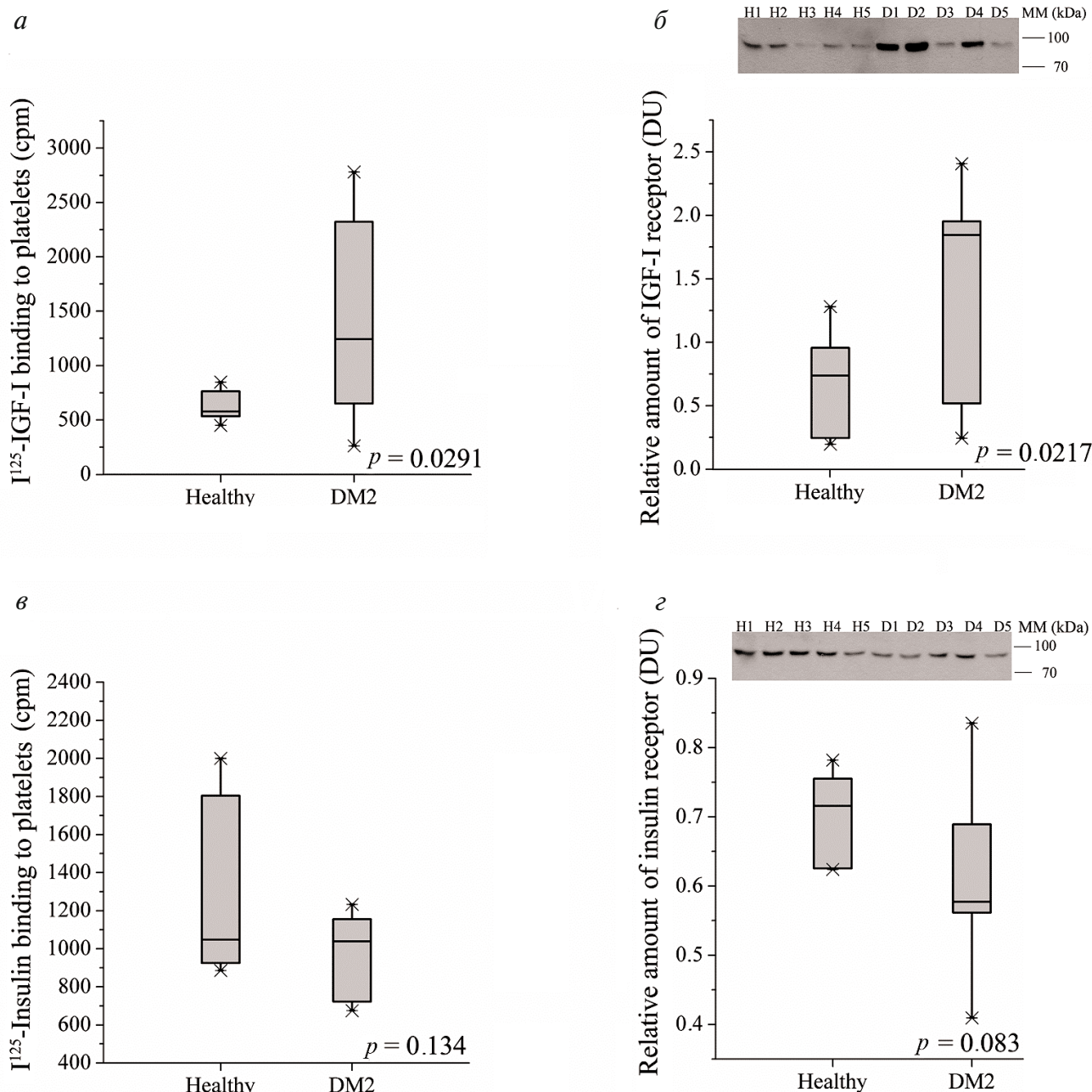


Рис. 1. Связывание ^{125}I -меченого IGF-1 с тромбоцитами (а), относительный уровень экспрессии в тромбоцитах рецептора IGF-1 (IGF-1R) (б), связывание ^{125}I -меченого инсулина с тромбоцитами (в) и относительный уровень экспрессии в тромбоцитах рецептора инсулина (IR) (з), выделенных из образцов крови здоровых людей ($n = 20$) и больных сахарным диабетом 2-го типа (DM2) ($n = 20$). Репрезентативные иммуноблоты показаны на панелях (б) и (з), образцы были промаркированы как Н (1–5) и Д (1–5). Различия между двумя группами выражены в виде значений p

Результаты определения связывания меченого ^{125}I инсулина (рис. 1, *в*) и в присутствии инсулинового рецептора (рис. 1, *з*) показали, что нет статистически достоверных различий между двумя популяционными группами, хотя значения, полученные в группе больных DM2, были несколько ниже, чем у группы здоровых людей. Используя данные по специфической активности радиоактивно меченого инсулина ($2,22 \times 10^9$ cpm/нмоль), было рассчитано, что количество инсулина, связанного с поверхностью тромбоцитов составляет 0,38 (0,322–0,711) фмоль у здоровых людей и 0,34 (0,245–0,442) фмоль у больных DM2. Интенсивность полученных сигналов в иммуноблотах нормализовали по интенсивности окрашенных белков Ponceau S, получив относительные уровни IGF-1R и IR-суммарного протеома тромбоцитов. Репрезентативный иммуноблот с пятью образцами из каждой исследованной группы показан на рис. 1, *з* (результаты окрашивания белковых полос в тех же образцах красителем Ponceau S представлены на рис. 1 Приложения). Статистический анализ проводили с использованием всех выборок ($n = 20$ в каждой группе).

Если провести сравнение соотношения показателей связывания IGF-1 и инсулина, то у здоровых людей оно составляет 1,87 (1,309–2,805) и 4,97 (2,285–6,952) у больных с сахарным диабетом 2-го типа. Эти различия статистически достоверны ($p = 0,012$), и полученные соотношения косвенно свидетельствуют о большей чувствительности тромбоцитов к экзогенному IGF-1, чем к инсулину, причем эффект более выражен у больных DM, чем у здоровых людей.

Анализ агрегации тромбоцитов. Так как инсулиноподобный фактор роста 1 может усиливать индуцированную агонистами активацию тромбоцитов, в следующих экспериментах нами была изучена возможная связь между увеличением количества IGF-1R на мембране тромбоцитов у больных сахарным диабетом 2-го типа и начальной скоростью агрегации тромбоцитов. Изолированные тромбоциты из обеих исследуемых групп обрабатывали экзогенным IGF-1 (конечная концентрация 100 нМ) и запускали процесс их агрегации, добавляя тромбин. Для каждого образца определяли начальную скорость агрегации тромбоцитов в присутствии и в отсутствии экзогенного IGF-1. Результаты представлены на рис. 2, *а*. Затем влияние IGF-1 на тромбоциты оценивали, как выраженное в процентах увеличение начальной скорости агрегации тромбоцитов в присутствии IGF-1 по сравнению со скоростью агрегации в его отсутствие.

Полученные нами результаты свидетельствовали о том, что добавление экзогенного ин-

сулиноподобного фактора роста 1 приводит к увеличению (как и ожидалось) начальной скорости агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином, в обеих исследуемых группах людей. Этот эффект IGF-1 был более заметен у больных DM2 (рис. 2, *б*). Полученные результаты позволяют предположить, что повышение экспрессии рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 на мембранах тромбоцитов приводит к увеличению количества связанного с тромбоцитами IGF-1 и повышению начальной скорости агрегации тромбоцитов у больных DM2.

В связи с тем, что гликированный гемоглобин используется как маркер при мониторинге гликемического профиля больных DM, представляется целесообразным исследовать возможную корреляцию между уровнем HbA1c и влиянием инсулиноподобного фактора роста 1 на процесс агрегации тромбоцитов. В результате была выявлена слабая корреляция между увеличением начальной скорости агрегации тромбоцитов в присутствии IGF-1 и концентрацией HbA1c в крови больных (рис. 2, *в*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что в присутствии агонистов инсулиноподобный фактор роста 1 усиливает активацию тромбоцитов крови [25]. В то же время этот белок в одиночку не может активировать тромбоциты. Присутствие агонистов является обязательным условием. IGF-1 воздействует на тромбоциты через сигнальный путь: IGF-1R/субстрат инсулинового рецептора/фосфоинозитид 3-киназа/протеинкиназа B [18, 19], как эндокринный, паракринный или аутокринный фактор, благодаря своему присутствию в кровотоке и в α -гранулах тромбоцитов [26]. Также было показано, что тромбоциты способны специфически связывать белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста IGFBP-3 [27] и, возможно, IGFBP-1, которые могут взаимодействовать с интегрином $\alpha 5 \beta 1$, локализованным на поверхности тромбоцитов [28], что способствует сближению IGF-1 и его рецептора. Локальная концентрация IGF-1 может также повышаться в результате взаимодействия белков IGFBP-1 и IGFBP-3 с фибриногеном/фибрином [29, 30].

Результаты нашей работы свидетельствуют о существовании прямой корреляции между степенью связывания IGF-1 и уровнем экспрессии его рецептора на поверхности тромбоцитов, выделенных из крови здоровых людей и больных сахарным диабетом 2-го типа. У больных DM2

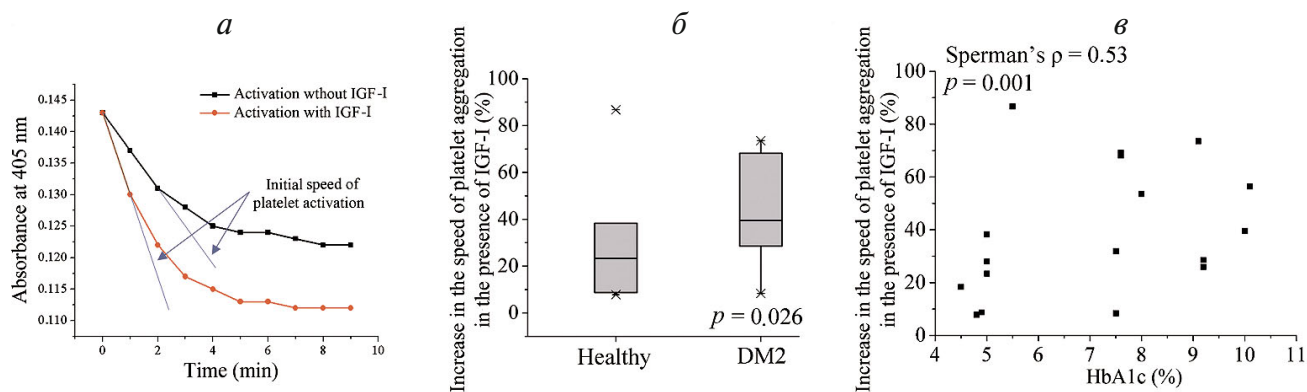


Рис. 2. Определение начальной скорости активации тромбоцитов в отсутствии или в присутствии экзогенного IGF-1 (а – репрезентативный пример), возрастание начальной скорости агрегации тромбоцитов в присутствии IGF-1 (б) и корреляция между рассчитанным влиянием IGF-1 на начальную скорость агрегации тромбоцитов и концентрацией гликированного гемоглобина (HbA1c) (в). Различия между двумя группами выражены в виде значений p , и корреляция выражена в виде значений ρ коэффициента корреляции Спирмена.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

было выявлено повышение связывания [125 I]-меченого IGF-1 и повышение экспрессии его рецептора в тромбоцитах. Уровень связывания меченого [125 I] инсулина с тромбоцитами в группе больных DM2 был ниже, чем в группе здоровых людей, однако эти различия не были статистически достоверными. В целом, полученные нами результаты соответствуют литературным данным [31, 32]. В противоположность результатам, полученным на мышах, результаты экспериментов на образцах, полученных от людей, предполагают, что инсулин не оказывает существенного влияния на функционирование тромбоцитов [16, 20]. В целом, полученные противоположные результаты оправдывают необходимость дальнейшего изучения факторов, оказывающих влияние на процесс активации тромбоцитов.

Как уже было сказано ранее, кроме образования гомодимеров, тромбоциты экспрессируют гибридные рецепторы (IGF-1R/IR) [16], для которых характерно большее сродство к IGF-1 по сравнению с инсулином [17]. Вероятно, экспрессия рецептора инсулина на тромбоцитах низка и большинство субъединиц IR участвуют в образовании гибридных рецепторов [16]. Результаты, полученные в нашей лаборатории с использованием меченых радиоактивным изотопом йода IGF-1 и инсулина, свидетельствуют в пользу большей предпочтительности IGF-1R в сравнении с IR, что вполне соответствует литературным данным [16]. Поскольку мы обнаружили увеличение уровня экспрессии IGF-1R на тромбоцитах у больных сахарным диабетом 2-го типа вместе с небольшим снижением уровня экспрессии рецептора инсулина, то можно предположить, что повышена экспрессия гомо-

димера рецептора IGF-1. Другим возможным объяснением, которое еще более вероятно, является то, что повышенная экспрессия IGF-1R может вызвать дополнительное образование гибридных рецепторов вместо гомодимеров IR. Это событие могло бы объяснить наблюдаемую тенденцию снижения связывания инсулина.

При обсуждении полученных нами результатов необходимо помнить о существовании гомологии между рецептором IGF-1 и рецептором инсулина и о перекрестных реакциях между IGF-1 и инсулином с этими рецепторами и их гибридом, хотя при этом наблюдаются различные константы связывания. Тромбоциты содержат все типы рецепторов но принято считать, что каждый лиганд предпочтительно связывается со своим специфичным рецептором благодаря высокому сродству. Стоит также упомянуть, что из-за очень низкого уровня экспрессии IGF-1R и IR в физиологических образцах требуются большие количества ткани/клеток для их выделения и разделения, что не применимо в случае тромбоцитов.

Конечные концентрации обоих лигандов составляют 45 пмоль, что $\sim 5\times$ меньше концентрации свободного IGF-1 в крови [33]. Эта концентрация также сходна с физиологической концентрацией инсулина [34]. Количество тромбоцитов, использованных в наших экспериментах, было того же порядка, что и в крови. Так как ожидается, что при физиологических условиях оба лиганда реагируют с их специфичными рецепторами, можно допустить, что в наших экспериментальных условиях происходит то же самое, и возможность перекрестных реакций незначительна. Сродство IGF-1R и гибридных рецепторов сход-

но друг с другом и намного выше для IGF-1, чем для инсулина, поэтому ожидается, что они оба связывают предпочтительно IGF-1 [35].

Более интенсивное связывание тромбоцитами добавленного экзогенного IGF-1 приводит к усилению процесса их агрегации, индуцированной тромбином, и этот эффект наиболее выражен у тромбоцитов, полученных из крови больных DM2. Согласно полученным нами результатам, по-видимому, концентрация IGF-1 в кровотоке может быть одним из факторов, влияющих на процесс активации тромбоцитов у больных сахарным диабетом. Слабая положительная корреляция между концентрацией HbA1c и скоростью индуцированной тромбином активации тромбоцитов при добавлении экзогенного инсулиноподобного фактора роста 1 подразумевает, что тяжесть протекания DM2 может быть связана с влиянием IGF-1. Увеличение количества IGF-1R может быть одним из факторов, ответственных за этот эффект. Однако необходимы дальнейшие эксперименты, чтобы делать такие выводы. Удаление рецепторов инсулина из тромбоцитов в мышинной модели DM (*ir*-нокаутированные мыши) способствовало тому, что эти мыши становились менее восприимчивыми к действию IGF-1. Авторы статьи утверждают, что этот эффект скорее всего является следствием пониженной экспрессии гибридных рецепторов [20]. В 2013 г. Stolla et al. показали, что IGF-1 способен повышать активацию тромбоцитов в присутствии активированного протеазой рецептора PAR4 [21]. Так как PAR4 является рецептором тромбина, а мы также использовали тромбин для активации тромбоцитов, то мог по-

явиться синергичный эффект действия IGF-1 и тромбина, который, наряду с другими эффектами, вносил свой вклад в механизм повышенной активации тромбоцитов при сахарном диабете.

Тромбоциты человека, выделенные из крови больных со слабо контролируемым DM2, отличаются повышенным уровнем экспрессии субъединиц IGF-1R. Это может быть одной из причин более высокой чувствительности тромбоцитов к стимуляции, вызываемой добавлением IGF-1, в условиях, когда агрегация тромбоцитов инициируется тромбином за счет увеличения скорости их активации. Однако необходимы дальнейшие исследования, направленные на изучение возможной роли IGF-1 в тромботических осложнениях, которые сопровождают течение сахарного диабета.

Финансирование. Проведение данной работы было поддержано Министерством образования, науки и технологий Республики Сербия (грант № 173042).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Проведение данной работы было одобрено Комитетом по этике при Институте прикладной ядерной энергии (INER). Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tripodi, A., Branchi, A., Chantarangkul, V., Clerici, M., Merati, G., Artoni, A., and Mannucci, P.M. (2011) Hypercoagulability in patients with type 2 diabetes mellitus detected by a thrombin generation assay, *J. Thromb. Thrombolysis*, **31**, 165–172.
2. Carr, M.E. (2001) Diabetes mellitus. A hypercoagulable state, *J. Diabetes Complications*, **15**, 44–54.
3. Vazzana, N., Ranalli, P., Cuccurullo, C., and Davi, G. (2012) Diabetes mellitus and thrombosis, *Thromb. Res.*, **129**, 371–377.
4. Dunn, E.J., Ariens, R.A., and Grant, P.J. (2005) The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function, *Diabetologia*, **48**, 1198–1206.
5. Dunn, E.J., Philippou, H., Ariens, R.A., and Grant, P.J. (2006) Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus, *Diabetologia*, **49**, 1071–1080.
6. Dunn, E.J., and Ariens, R.A. (2004) Fibrinogen and fibrin clot structure in diabetes, *Herz*, **29**, 470–479.
7. Kim, J.H., Bae, H.Y., and Kim, S.Y. (2013) Clinical marker of platelet hyperreactivity in diabetes mellitus, *Diabetes Metab. J.*, **37**, 423–428.
8. Pomeroy, F., Di Minno, M.N.D., Fenoglio, L., Gianni, M., Ageno, W., and Dentali, F. (2015) Is diabetes a hypercoagulable state? A critical appraisal, *Acta Diabetol.*, **52**, 1007–1016.
9. Kakouros, N., Rade, J.J., Kourliouros, A., and Resar, J.R. (2011) Platelet function in patients with diabetes mellitus: from a theoretical to a practical perspective, *Int. J. Endocrinol.*, **2011**, 742719.
10. Hu, L., Chang, L., Zhang, Y., Zhai, L., Zhang, S., Qi, Z., Yan, H., Yan, Y., Luo, X., Zhang, S., Wang, Y., Kunapuli, S.P., Ye, H., and Ding, Z. (2017) Platelets express activated P2Y₁₂ receptor in patients with diabetes mellitus, *Circulation*, **136**, 817–833.
11. Di Minno, M.N.D., Lupoli, R., Palmieri, N.M., Russolillo, A., Buonauro, A., and Di Minno, G. (2012) Aspirin resistance, platelet turnover, and diabetic angiopathy: a 2011 update, *Thromb. Res.*, **129**, 341–344.
12. Randriamboavonjy, V., and Fleming, I. (2009) Insulin, insulin resistance, and platelet signaling in diabetes, *Diabetes Care*, **32**, 528–530.
13. Ferreiro, J.L., Gomez-Hospital, J.A., and Angiolillo, D.J. (2010) Platelet abnormalities in diabetes mellitus, *Diab. Vasc. Dis. Res.*, **7**, 251–259.

14. Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E. (2011) The IGF system, *Acta Diabetol.*, **48**, 1–9.
15. Aghdam, S.Y., Eming, S.A., Willenborg, S., Neuhaus, B., Niessen, C.M., Partridge, L., Krieg, T., and Bruning, J.C. (2012) Vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling controls skin wound vascularization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **421**, 197–202.
16. Hunter, R.W., and Hers, I. (2009) Insulin/IGF-1 hybrid receptor expression on human platelets: consequences for the effect of insulin on platelet function, *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 2123–2130.
17. Andersen, M., Norgaard-Pedersen, D., Brandt, J., Pettersson, I. and Slaaby, R. (2017) IGF1 and IGF2 specificities to the two insulin receptor isoforms are determined by insulin receptor amino acid 718, *PLoS One*, **12**, e0178885.
18. Kim, S., Garcia, A., Jackson, S.P., and Kunapuli, S.P. (2007) Insulin-like growth factor-1 regulates platelet activation through PI3-K α isoform, *Blood*, **110**, 4206–4213.
19. Hers, I. (2007) Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS-PI3K α pathway, *Blood*, **110**, 4243–4252.
20. Moore, S.F., Williams, C.M., Brown, E., Blair, T.A., Harper, M.T., Coward, R.J., Poole, A.W., and Hers, I. (2015) Loss of the insulin receptor in murine megakaryocytes/platelets causes thrombocytosis and alterations in IGF signaling, *Cardiovasc. Res.*, **107**, 9–19.
21. Stolla, M.C., Li, D., Lu, L., and Woulfe, D.S. (2013) Enhanced platelet activity and thrombosis in a murine model of type 1 diabetes are partially insulin-like growth factor 1-dependent and phosphoinositide 3-kinase-dependent, *J. Thromb. Haemost.*, **11**, 919–929.
22. Hunter, W.M., and Greenwood, F.C. (1963) Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity, *Biochem. J.*, **89**, 114–123.
23. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
24. Bednar, B., Condra, C., Gould, R.J., and Connolly, T.M. (1995) Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists, *Thromb. Res.*, **77**, 453–463.
25. Motani, A.S., Anggard, E.E., and Ferns, G.A.A. (1996) Recombinant insulin-like growth factor-1 modulates aggregation in human platelets via extracellular calcium, *Life Sci.*, **58**, 269–74.
26. Blair, P., and Flaumenhaft, R. (2009) Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates, *Blood Rev.*, **23**, 177–189.
27. Taylor, V.L., and Spencer, E.M. (2001) Characterisation of insulin-like growth factor-binding protein-3 binding to a novel receptor on human platelet membranes, *J. Endocrinol.*, **168**, 307–315.
28. Simic, D., Bogdan, N., Teng, F., and Otieno, M. (2017) Blocking $\alpha 5\beta 1$ integrin attenuates sCD40L-mediated platelet activation, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, **23**, 607–614.
29. Campbell, P.G., Durham, S.K., Hayes, J.D., Suwanichkul, A., and Powell, D.R. (1999) Insulin-like growth factor-binding protein-3 binds fibrinogen and fibrin, *J. Biol. Chem.*, **274**, 30215–30221.
30. Gligorijevic, N., and Nedic, O. (2016) Interaction between fibrinogen and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human plasma under physiological conditions, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 135–140.
31. Udvardy, M., Pfliegler, G., and Rak, K. (1985) Platelet insulin receptor determination in non-insulin dependent diabetes mellitus, *Experientia*, **41**, 422–423.
32. Boucher, J., Kleinridders, A., and Khan, R. (2014) Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**, a009191.
33. Vestergaard, P.F., Hansen, M., Frystyk, J., Espelund, U., Christiansen, J.S., Jorgensen, J.O., and Fisker, S. (2013) Serum levels of bioactive IGF1 and physiological markers of ageing in healthy adults, *Eur. J. Endocrinol.*, **170**, 229–236.
34. Wilcox, G. (2005) Insulin and insulin resistance, *Clin. Biochem. Rev.*, **26**, 19–39.
35. Benyoucef, S., Katharina, H., Surinya, K.H., Hadaschik, D., and Siddle, K. (2007) Characterization of insulin/IGF hybrid receptors: contributions of the insulin receptor L2 and Fn1 domains and the alternatively spliced exon 11 sequence to ligand binding and receptor activation, *Biochem. J.*, **403**, 603–613.

AN ENHANCED PLATELET SENSITIVITY TO IGF-1 IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2

N. Gligorijevic*, D. Robajac, and O. Nedic

Institute for the Application of Nuclear Energy (INEP), University of Belgrade, 11080 Belgrade, Serbia; E-mail: nikolag@inep.co.rs

Received April 3, 2019

Revised June 8, 2019

Accepted June 24, 2019

Diabetes mellitus is characterized by an increased platelet activation mediated by many factors including changes in the expression of platelet membrane proteins. The aim of this study was to investigate the sensitivity of human platelets towards insulin-like growth factor (IGF) system in patients with poorly controlled diabetes mellitus type 2 (DM2). ¹²⁵I-labelled insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin were used for the analysis of ligand binding, and Western blot for determination of the relative expression level of IGF-1 and insulin receptors (IGF-1R and IR, respectively). Aggregation of platelets in the presence of IGF-1 was studied by plate aggregometry assay. IGF-1 binding and IGF-1R expression level were significantly higher in platelets from DM2 patients compared to healthy persons. Insulin binding and IR expression level were generally lower in DM2 group, but the differences were not statistically significant. Potentiating effect of IGF-1 on thrombin-induced activation of platelets was detected in both groups, being significantly more pronounced in platelets from DM2 patients. Initial speed of platelet activation in the presence of IGF-1 positively correlated with concentration of glycated hemoglobin (HbA1c). Thus, platelets from DM2 patients have an increased expression of IGF-1R subunits, which may contribute to their higher sensitivity towards IGF-1 due to an increase in rate of their activation during thrombin-induced aggregation. However, further experiments are needed to investigate a potential role of IGF-1 in thrombotic complications accompanying diabetes.

Keywords: blood platelets, diabetes mellitus type 2, hemostasis, insulin-like growth factor-1, platelet aggregation