

УДК 612.111.7

©Коллектив авторов

АКТИВАТОРЫ, РЕЦЕПТОРЫ И ПУТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ В ТРОМБОЦИТАХ КРОВИ

В.И. Шатурный^{1а}, С.С. Шахиджанов^{1а}, А.Н. Свешникова^{1,2}, М.А. Пантелеев^{1,2,3}*

¹Физический факультет, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2; факс: 8-495-6128870; эл. почта: msuff@mail.ru, schakhidjanov.s@yandex.ru

²Гематологический научный центр Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

³Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук, 117977 Москва, ул. Косыгина, 4

а - авторы внесли одинаковый вклад в данную работу

Для поддержания нормального гемостаза – остановки кровотечения в случае повреждения сосуда – необходимы специализированные клетки, тромбоциты, которые при повреждении способны взаимодействовать друг с другом и с повреждёнными тканями, тем самым образуя специальный агрегат, способный остановить кровотечение, – гемостатическую пробку. Для участия тромбоцита в процессе образования пробки (агрегации) ему необходимо перейти в „активированное“ состояние под действием таких факторов как ADP, тромбоксан A_2 , коллаген, тромбин, АТР и других. В данном обзоре рассмотрены механизмы действия различных активаторов и запускаемые ими сигнальные каскады в тромбоцитах, а также механизмы ингибирования сигнальной трансдукции, осуществляемой через эти каскады рассматриваются. Под действием коллагена тромбоциты начинают процесс тромбообразования, что сопровождается агрегацией и ростом тромбоцитарного сгустка, активацией интегринов, секрецией гранул и повышением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Тромбин, ADP, тромбоксан A_2 и АТР способствуют активации других тромбоцитов и вызывают дополнительную секрецию активирующих веществ. Эндотелий сосудов и секреторные органы также влияют на активацию тромбоцитов, вырабатывая как усиливающие, так и ингибирующие её вещества, тем самым устанавливая соотношение сигналов активации и ингибирования, которое играет критически важную роль в формировании тромбоцитарного агрегата в норме и в условиях патологии. Пути сигнализации тромбоцитов еще слабо изучены, и их исследование представляет собой актуальную задачу как для фундаментальной клеточной биологии, так и для разработки новых лекарственных препаратов, методов диагностики и способов лечения нарушений системы гемостаза.

Ключевые слова: тромбоциты, коллаген, тромбин, ADP, тромбоксан A_2 , ингибирование.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Тромбоциты – небольшие (2-4 мкм диаметром) дисковидные безъядерные клетки или даже клеточные фрагменты, образующиеся при фрагментации своих предшественников мегакариоцитов в костном мозге. Они циркулируют в кровотоке и реагируют на повреждения сосуда. Их агрегация в месте повреждения сосуда является основным этапом процесса формирования сгустка, обеспечивающим как функционирование нормального гемостаза (остановки кровотечения), так и развитие патологического тромбоза (перекрытие просвета сосуда), связанного с нарушениями работы сердечно-сосудистой системы и являющегося ведущей причиной смертности и инвалидности в развитых странах.

Особенностью тромбоцита является его способность к активации – быстрому и (как правило) необратимому переходу в новое состояние. Стимулом активации может служить практически любое возмущение окружающей среды, вплоть до простого механического напряжения, но важнейшими активаторами являются несколько веществ, рассмотренных ниже.

Активация тромбоцитов прежде всего происходит под действием таких агонистов как коллаген, ADP, тромбин и тромбоксан A_2 (TXA_2). При активации происходит выброс активирующих веществ, что приводит к активации и, соответственно, к появлению способности к агрегации у других тромбоцитов. Будучи активированными, тромбоциты становятся способны прикрепляться к месту повреждения (адгезия) и друг к другу (агрегация), формируя пробку, перекрывающую повреждение [1-4].

В настоящий момент считается, что ключевым элементом в запуске тромбообразования является первоначальное прикрепление неактивированного тромбоцита к коллагену, являющимся компонентом сосудистого эндотелия, который становится доступным при повреждении стенок сосуда [5-7]. При этом происходит активация тромбоцита, сопровождающаяся выбросом дополнительных агонистов (тромбина, ADP и TXA_2), способных активировать другие тромбоциты. К тому же активированные тромбоциты становятся способными к более прочной адгезии, что приводит к росту тромбоцитарного агрегата в месте повреждения.

Таким образом, активация тромбоцитов *in vivo* представляет собой сложный процесс, в котором задействованы многочисленные агонисты и рецепторы, а также сложные пути сигнализации, общая схема которой приведена на рисунке 1. Для понимания процесса активации тромбоцитов в процессе тромбообразования необходимо иметь представление о вкладах каждого отдельного агониста в активацию, о сигнальных путях, запускающихся при связывании агонистов со своими рецепторами, а также знать конечный ответ тромбоцита на действие каждого из агонистов. Знания в этой области исследований, которая крайне актуальна как для фундаментальной клеточной биологии, так и для разработки новых лекарственных препаратов, в последнее время очень быстро обновляются, приводя к стремительному устареванию предыдущих обзоров.

Целью данного обзора является детальное описание современных представлений о действии коллагена, тромбина, ADP и TXA_2 на тромбоцит при его активации, рассмотрение роли АТР в активации тромбоцитов, а также механизмов ингибирования активации тромбоцитов.

Рисунок 1.

Схема сигнального каскада в тромбоците.

На рисунке представлена схема сигнального каскада. Сигнальный каскад запускается при связывании PGI_2 , ADP, тромбина, TxA_2 АТР, коллагена со своими рецепторами. PGI_2 связывается с рецептором IP , который сопряжён с G_s -белком. Этот белок передаёт сигнал на аденилатциклазу (AC), которая контролирует уровень cAMP, и, тем самым, ингибирование активации тромбоцита. Уровень cAMP также зависит от активности фосфодиэстераз (PDE). ADP связывается с рецепторами P2Y_{12} и P2Y_1 , которые сопряжены с G_i - и G_q -белками соответственно. Сигнал через G_i -белок ингибирует активность аденилатциклазы (AC) и передаёт сигнал PI3 -киназам (PI3K), что приводит к активации MAP-киназ (MAPKs), и в дальнейшем к синтезу TxA_2 и секреции гранул. Сигнал через G_q -белок активирует фосфолипазу C ($\text{PLC}\beta$) и в результате её действия способствует образованию диацилглицерина (DAG) и инозитолтрифосфата (IP_3), которые активируют протеинкиназу C (PKC) и стимулируют высвобождение кальция из плотной тубулярной системы, соответственно, что приводит к изменению формы и секреции гранул. Тромбин связывается с PAR1 и PAR4 рецепторами, которые сопряжены с G_i -, G_q - и $\text{G}_{12/13}$ -белками. Сигнализация через $\text{G}_{12/13}$ -белок активирует RhoA-ГТФазы и Rho-киназы, что стимулирует изменение формы цитоскелета и секреции гранул. Сигнализация через G_i - и G_q -белки аналогична описанной выше. TxA_2 связывается с TP -рецептором, который сопряжён с $\text{G}_{12/13}$ -белком. Сигнальный каскад, вызываемый этим рецептором аналогичен. АТР связывается с рецептором P2X_1 , который представляет собой кальциевый канал. Его открытие приводит к входу Ca^{2+} в цитоплазму, что способствует централизации секреторных гранул и активации протеинкиназы C (PKC) и кальмодулина (calmodulin). Коллаген связывается с гликопротеином VI (GPVI) и интегрином $\alpha_2\beta_1$ (a2b1), что приводит к активации фосфолипазы $\text{C}\gamma_2$ (PLC), и в результате образованию диацилглицерина (DAG) и инозитолтрифосфата (IP_3), которые активируют протеин киназу C (PKC) и CaIDAGGEF1 . Это способствует активации MAP-киназ (MAPKs) и в дальнейшем к синтезу TxA_2 и секреции гранул. NO стимулирует повышение уровня активности растворимой гуанилциклазы (sGC), что приводит к падению уровня внутриклеточного Ca^{2+} и ингибированию активации тромбоцита. Адаптировано с некоторыми изменениями из [52].

1. АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ КОЛЛАГЕНОМ.

В нормальных условиях циркулирующие в крови тромбоциты не прикрепляются к стенке сосуда, которая изнутри покрыта монослоем эндотелиальных клеток. При повреждении сосуда становятся доступными структуры, расположенные под эндотелием, с которыми тромбоциты вступают в контакт. В результате этого контакта тромбоциты адгезируют к поврежденным тканям. Главные субстраты адгезии и первоначальной агрегации и активации, присутствующие в субэндотелии – коллагены различных типов. Тромбоциты имеют два прямых рецептора к коллагену, а именно гликопротеин VI (GPVI) и интегрин $\alpha_2\beta_1$. Несмотря на обширные исследования, их роль в адгезии тромбоцитов и активации остается предметом дискуссий. В настоящее время считается, что GPVI важен для активации и агрегации тромбоцитов, а интегрин $\alpha_2\beta_1$ для обеспечения сильной адгезии и вносит лишь незначительный вклад в активацию клеток [8]. Также к коллагену I и III типов может прикрепляться фактор фон Виллебранда (vWF), представляющий собой длинный мултимер и содержащийся в кровотоке, в тельцах Вейбла-Палада клеток эндотелия и α -гранулах тромбоцитов. Фактор фон Виллебранда в свою очередь связывается с рецептором гликопротеином Ib (GPIb) (являющийся частью комплекса гликопротеина Ib-V-IX (GPIb-V-IX)), что является одним из первых шагов адгезии тромбоцитов. GPIb крепко связан с цитоскелетом тромбоцита через актин-связывающий белок 14-3-3 ζ , и при его

активации происходит перестройка актинового цитоскелета тромбоцита [9]. Таким образом, полный "комплект начальной адгезии к коллагену" включает в себя три рецептора: непрямого GPIb для начального зацепления, GPVI для активации и $\alpha_2\beta_1$ для полноценной адгезии.

Гликопротеин VI.

GPVI содержит остаток аргинина в своем трансмембранном домене, который образует солевой мостик с остатком аспарагиновой кислоты, содержащейся в трансмембранном домене γ -цепи Fc рецептора (FcR γ -chain). Это позволяет GPVI образовывать комплекс с FcR γ -chain, который содержит домен ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), предназначенный для передачи сигнала. Также GPVI связан с Src (sarcoma) тирозинкиназами Fyn и Lyn, связанными с цитоплазматическим хвостом GPVI своими доменами SRC Homology 3 (SH3). Фосфорилирование ITAM тирозинкиназами Fyn и Lyn позволяет активировать тирозинкиназу Syk (Spleen tyrosine kinase). Активированная Syk, в свою очередь, индуцирует сигнальный каскад реакций, который приводит к активации фосфолипазы C γ 2 (PLC γ 2), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), и малых G белков [10-11], что в конечном счете приводит к мобилизации ионов кальция, выходу гранул, активации интегринов и агрегации тромбоцитов (рис. 2). GPVI-ITAM сигнализация может быть затруднена ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-base Inhibition Motif). В тромбоцитах ITIM-рецепторы активируют цитоплазматические тирозинфосфатазы SHP1 и SHP2, тем самым препятствуя активации PLC γ 2 [12].

PLC γ 2 гидролизует фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат, что в итоге приводит к образованию инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3) и мембраносвязанного 1,2-диацилглицерина (DAG). IP3 – маленькая, быстро диффундирующая водорастворимая молекула, служит в качестве вторичного посредника и связывается с IP3 рецептором (IP3R). IP3R является кальций-селективным катионным каналом, который вызывает выход Ca²⁺ из эндоплазматического ретикула (ЭПР), в результате чего повышается уровень цитоплазматического Ca²⁺ [13]. Повышение концентрации Ca²⁺ в цитозоле и концентрации DAG приводит к активации фосфолипазы A₂ (PLA2), изменению формы тромбоцитов, секреции гранул и в конечном итоге к агрегации. Повышенной концентрации Ca²⁺ в цитозоле противодействует набор мембранных АТФаз (PMCA), которые выкачивают Ca²⁺ из цитозоля во внеклеточное пространство, и сарко/эндоплазматических АТФаз (SERCA), которые качают Ca²⁺ назад в ЭПР. Уменьшение концентрации Ca²⁺ во внутриклеточных депо обнаруживается STIM1 (sensor stromal interaction molecule 1) [14], которая открывает SOC (store-operated calcium channels) в плазматической мембране, способствующие входу кальция из внеклеточного пространства. В качестве канала SOC в тромбоцитах был идентифицирован Orai1, также называемый CRACM1 (Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels Modulator 1) [15].

Одним из Ca²⁺-чувствительных белков является α -изоформа протеинкиназы C (PKC). Увеличение концентрации внутриклеточного Ca²⁺ позволяет PKC связываться с фосфатидилсерином на мембране, что способствует PKC-DAG взаимодействию и последующей активации PKC [16]. Отсутствие PKC приводит к снижению образования плотных гранул в процессе тромбоцитогенеза и почти полностью ингибирует выделение плотных или α -гранул при активации. Другим чувствительным к уровню Ca²⁺ белком является CalDAG-GEF1 (Ca²⁺ and DiAcylGlycerol-regulated Guanine nucleotide Exchange Factor 1) [17], который контролирует активацию Rap1b (Ras-related

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ТРОМБОЦИТАХ

protein) [18] – малых GTPаз, регуляторов активации интегринов, а также, скорее всего, способность тромбоцитов регулировать изменение цитоскелета через взаимодействие с RIAM (Rap1-interacting adaptor molecule). Отсутствие либо CalDAG-GEF1, либо Rap1b в тромбоцитах ведет к снижению активации интегринов и защите от артериального тромбоза [20]. CalDAG-GEF1 также может участвовать в активации РКС с помощью Rap1-зависимое образование TXA_2 [17]. Последние исследования показывают, что CalDAG-GEF1 играет важную роль в, так называемой, сигнализации “изнутри-наружу” (сигналы, исходящие от других рецепторов, активируют внутриклеточные сигнальные пути, в результате которых происходит конформационное изменение цитоплазматических доменов интегрина, что увеличивает аффинность интегрина к лиганду) [19, 20]. CalDAG-GEF1 также преобразует Rap1 из GDP-связанной формы в активную GTP-связанную форму, которая взаимодействует с RIAM [21].

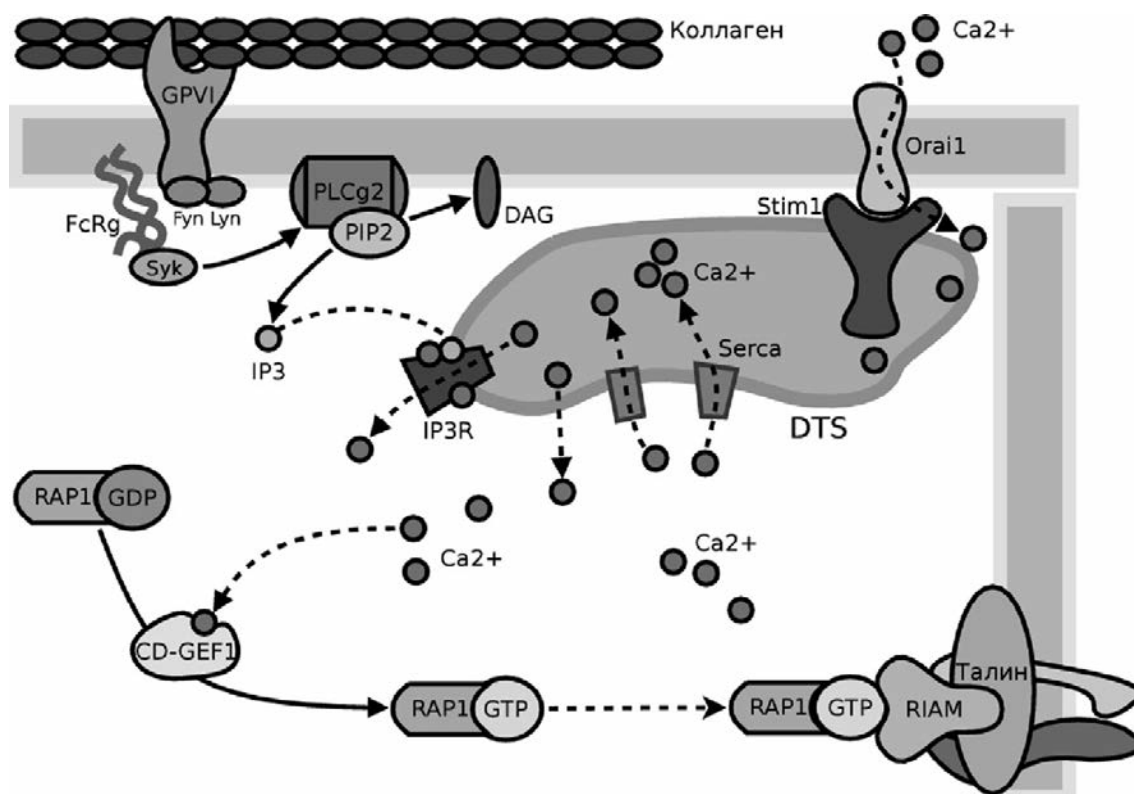


Рисунок 2.

Схема активации тромбоцитов коллагеном при его связывании с гликопротеином VI. Коллаген связывается с гликопротеином VI (GPVI), который образует комплекс с FcRγ-chain (FcRg), а также связан с тирозинкиназами Fyn и Lyn, которые активируют тирозинкиназу Syk. Активированная Syk индуцирует сигнальный каскад реакций, который приводит к активации фосфолипазы $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$), и в результате образованию диацилглицерина (DAG) и инозитолтрифосфата (IP3). Это способствует повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Повышенной концентрации Ca^{2+} в цитозоле противодействует набор сарко/эндоплазматических АТФаз (Serca), которые качают Ca^{2+} назад в плотную тубулярную систему (DTS). Уменьшение концентрации Ca^{2+} в DTS обнаруживается STIM1, которая открывает Orai1 в плазматической мембране, и способствует входу кальция из внеклеточного пространства в цитозоль. Другим чувствительным к уровню Ca^{2+} белком является CalDAG-GEF1 (CD-GEF1), преобразующим Rap1 из GDP-связанной формы в активную GTP-связанную форму, которая взаимодействует с RIAM и активирует её.

Похожий сигнальный путь, что и GPVI, имеет рецептор CLEC-2 (C-type lectin-like type II transmembrane receptor), который был определен в результате анализа ответа тромбоцитов на активацию родоцитином. Однако он инициируется фосфорилированием hemITAM (single ITAM motif) [22, 23]. Но (пато)физиологический лиганд, связывающийся с CLEC-2, задействованный в образовании тромба, остается неизвестным, тем не менее предполагается, что он присутствует на поверхности активированного тромбоцита [24].

Активация тромбоцитов имеет несколько степеней, которые принято разделять на сильную и слабую. Под слабой степенью активации подразумевают активацию интегринов, изменение формы тромбоцита и секрецию его гранул. Сильная степень активации включает в себя, кроме выше перечисленного, еще и появление прокоагулянтной поверхности (тромбоциты предоставляют свою поверхность для ускорения реакций приводящих к полимеризации фибрина). Такой ответ тромбоцита способны вызвать только коллаген и тромбин [26, 27]. В последние годы было обнаружено, что при достижении тромбоцитами сильной степени активации, они делятся на две субпопуляции, различающиеся на несколько порядков по концентрации фосфатидилсерина и содержанию α -гранулярных белков на поверхности мембраны [25]. Тромбоциты, с более высокой концентрацией фосфатидилсерина на поверхности мембраны, получили название “укутанных” (coated) [25]. Таким образом, коллаген, связываясь с GPVI, приводит практически ко всем видам ответов, таких как повышение концентрации внутриклеточного кальция, секреции гранул, изменению формы, а также к высшей степени активации тромбоцита – прокоагулянтной активности [28]. Вклад различных путей сигнализации в формирование гетерогенности тромбоцитов был проанализирован в [29].

Интегрин $\alpha_2\beta_1$.

Интегрин $\alpha_2\beta_1$ – второй прямой рецептор коллагена (2000-4000 молекул на клетку), также известный, как GPIIb/IIIa, VLA-2 или CD49b/CD29), служит в основном для адгезии тромбоцитов и последующей активации [30, 31]. Точный путь сигнализации, ведущий к активации $\alpha_2\beta_1$ до сих пор не вполне ясен, но предполагается, что сигнализация GPVI приводит к конформационным изменениям цитоплазматических доменов интегрин, что увеличивает аффинность к коллагену [32, 33]. Недавние исследования показывают, что механизм активации $\alpha_2\beta_1$ является таким же, что и у других интегринов, и основан на взаимодействии α_1 цитоплазматического хвоста с талином и кинделином-3 [34, 35].

Кроме того, коллаген при связывании с $\alpha_2\beta_1$ также вызывает, так называемую, сигнализацию “снаружи-внутри” (связывание лиганда активирует внутриклеточные сигнальные пути) [8, 36]. Рецепторы $\alpha_2\beta_1$ связываются с GFOGER, что вызывает активацию Src и Syk киназ, а также PLC γ 2 [37]. Этот путь аналогичен сигнализации “снаружи-внутри” $\alpha_{IIb}\beta_3$, что указывает на общий сигнальный механизм. Тем не менее, сигнализация “снаружи-внутри”, вызванная интегрином $\alpha_2\beta_1$ остается плохо изученной, а также не известно, каким образом регулируется PI3k через этот интегрин [38]. Активация $\alpha_2\beta_1$ также может быть вызвана внешними воздействиями, например, в присутствии двухвалентных катионов Mn^{2+} , или восстановителей, которые разрывают дисульфидные связи внутри β -цепи, или активирующих анти- β_1 антител TS2/16 [39]. Хотя GPVI и $\alpha_2\beta_1$ структурно не связаны, они действуют вместе, усиливая способность друг друга к активации и способствуя полноценной адгезии тромбоцитов [11, 40].

2. АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ТРОМБИНОМ.

Тромбин циркулирует в кровотоке в неактивированном состоянии, в виде зимогена – протромбина, который превращается в активный фермент посредством расщепления в молекуле двух пептидных связей. Он является одним из основных активаторов тромбоцитов и главным ферментом системы свёртывания крови, который катализирует основную реакцию этой системы превращения фибриногена в фибрин.

Тромбин действует на тромбоциты в первую очередь за счёт необратимого связывания с клеточными PAR-рецепторами (Protease-Activated Receptors). На поверхности тромбоцитов человека имеется два сопряжённых с G-белками рецептора – PAR1 и PAR4, а у мышей – PAR3 и PAR4. При отщеплении N-концевого фрагмента у этих рецепторов происходит их активация [41], что приводит к моментальной активации тромбоцита. Однако до сих пор не ясна роль нетромбиновых протеаз, которые также способны активировать эти рецепторы. Рецептор PAR1 считается главным, высокоаффинным рецептором тромбина, его эффективная активация наблюдается при концентрациях тромбина порядка 50-200 пМ, а число молекул рецептора на поверхности одной клетки около 2000. PAR4 – это низкоаффинный рецептор, связывание тромбина с PAR4 вносит вклад в активацию тромбоцитов, главным образом, в условиях ингибирования или десенситизации PAR1. Предполагается, что главная функция PAR4 состоит в обеспечении избыточного состояния активации тромбоцитов тромбином, как одного из наиболее важных путей тромбоцитарного гемостаза [42-47]. Также известно, что PAR1 и PAR4 обладают разной кинетикой активации тромбоцитов. Так, PAR1 способствует моментальному повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , и очень быстро десенситизируется при больших концентрациях тромбина, в то время как PAR4 характеризуется более продолжительным ответом, и может поддерживать этот эффект при больших концентрациях тромбина [48]. Возможно, PAR1 обеспечивает зарождение волны активации тромбоцитов, а PAR4 обеспечивает её распространение в пространстве, вследствие причин перечисленных выше.

PAR1 и PAR4 напрямую сопряжены с G_q и $G_{12/13}$ белками. Известно также, что только PAR1, но не PAR4, напрямую сопряжён с G_i белком [49]. Передача сигнала с рецепторов на G_q белок приводит к активации фосфолипазы $C\beta$ (PLC β), и последующему расщеплению мембранных фосфоинозитидов, образованию DAG и IP $_3$, которые активируют PKC и стимулируют высвобождение кальция из плотной тубулярной системы (представлена группами трубочек, имеющих сходство с гладкой эндоплазматической сетью), соответственно, а также приводят к экспонированию фосфатидилсерина [50]. Экспонирование отрицательно заряженного фосфотидилсерина на поверхности тромбоцитов зависит от активации GPVI [51]. При концентрациях тромбина даже порядка 0,1 нМ концентрация ионов кальция в тромбоцитах может моментально повыситься десятикратно. Внутриклеточный кальций и DAG вместе активируют CalDAG-GEFI, который участвует в некоторых важных Ca^{2+} -зависимых ответах, включая активацию GTPазы RAP1b, активацию регулируемых внеклеточными сигналами киназ, выработку TXA $_2$ и секрецию гранул [45, 46, 52-55].

Передача сигналов с PAR-рецепторов на $G_{12/13}$ -белок активирует RhoA (GTPases Ras homolog gene family, member A) и Rho-киназы. Активированная Rho-киназа стимулирует фосфорилирование легких цепей миозина MLC

(Myosin Light Chain) [56, 57] и таким образом участвует в изменении формы цитоскелета. Кроме того, RhoA напрямую участвует в секреции гранул [42, 52].

Известно, что тромбин может снижать в тромбоцитах концентрацию cAMP, что обеспечивается как ингибированием аденилатциклазы через G_i белок, связанный с рецептором тромбина, или косвенно, способствуя выбросу ADP, так и повышением активности фосфодиэстераз. Но, предполагается, что этот эффект носит опосредованный характер, обеспечивающийся секрецией ADP и его действием на пуринэргический $P2Y_{12}$ рецептор [45].

Активация PAR1 также вызывает немедленное фосфорилирование Akt (Protein Kinase B), в то время как фосфорилирование Akt при активации PAR4 представляется длительным процессом, но оба эти процесса происходят независимо от ADP и PI3-киназ [58]. Тем не менее, активация сигнального пути PI3-киназ необходима PAR1 для того, чтобы индуцировать необратимую агрегацию тромбоцитов [59].

Кроме PAR-рецепторов тромбин способен связываться с GPIb-V-IX. Предполагается, что связывание с GPIb, облегчает взаимодействие ферментов с PAR-рецепторами, резко ускоряя их протеолиз, тем самым и ускоряя PAR-зависимую активацию тромбоцитов [60].

Таким образом, тромбин приводит к агрегации тромбоцитов, выбросу ADP и АТР, синтезу тромбоксана A_2 , а также, как и коллаген, способен приводить к самой сильной степени активации тромбоцита – прокоагулянтной активности.

3. АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ADP.

ADP содержится в плотных гранулах тромбоцита, которые начинают секретироваться при его активации [9]. Клетки сосудистого эндотелия, в случае их повреждении, тоже выбрасывают ADP, содержащийся в них. При добавлении ADP в систему *in vitro*, тромбоциты начинают синтезировать TXA_2 , это приводит к повышению уровня внутриклеточного Ca^{2+} , изменению их формы, происходит фосфорилирование белков, и начинается процесс агрегации тромбоцитов [61], причём агрегируют они тем сильнее, чем больше ADP было добавлено в систему [62]. Таким образом, в случае повреждения сосудистой стенки, некоторое количество тромбоцитов переходят в активированное состояние, и в крови появляется ADP, который может активировать другие тромбоциты.

На поверхности тромбоцитов имеется два типа пуринэргических рецепторов, связанных с G-белками – $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$, для которых основным лигандом является ADP, причём для нормальной активации, оба типа этих рецепторов должны экспонироваться клеткой [63]. Тромбоцит, в неактивном состоянии, содержит около 160 рецепторов $P2Y_1$ и 745 рецепторов $P2Y_{12}$ на своей поверхности. При активации тромбоцита под действием сильного активатора (тромбина или коллагена), количество этих рецепторов на его поверхности увеличивается, т.к. эти рецепторы содержатся в его α -гранулах, секретируемых тромбоцитом при его активации [64, 65].

Рецептор $P2Y_1$ передает сигнал на G_q белок, который активирует PLC β , что приводит к тем же ответам тромбоцита, что и при действии тромбина. Образованные в результате действия PLC β DAG и IP3 также принимают участие в сигнализации “изнутри-наружу” при участии интегринов [42, 51, 66-68].

Связывание ADP с рецептором $P2Y_{12}$ приводит к активации G_i -белка, что ведет к ингибированию аденилатциклазы и снижению уровня cAMP в клетке. Вместе G_i и G_q белки активируют SFK (Src family kinase)

Лип-киназу, которая запускает путь химических реакций, ведущих к секреции α -гранул и синтезу TXA_2 . SFK активирует PI3k и Akt-киназу, которая активирует NO-синтазу. Далее активируются cGMP-зависимая протеинкиназа (PKG), ведущая к ингибированию тромбоцитов и секреции α -гранул. А затем активируются MAPKs (mitogen-activated protein kinases), которые в свою очередь тоже приводят к секреции α -гранул, а также к синтезу тромбоксана A_2 [66, 69].

При блокировании или удалении рецептора P2Y_1 , ADP по-прежнему способен ингибировать формирование cAMP, но его способность вызывать увеличение внутриклеточного Ca^{2+} , изменять форму тромбоцитов и их агрегацию сильно снижается. У $\text{P2Y}_1^{-/-}$ мышей наблюдается незначительное увеличение продолжительности времени кровотечения, и возрастает устойчивость к тромбоэмболии, вызываемой введением ADP. Но у них не наблюдается предрасположенности к спонтанным кровотечениям [42].

Тромбоциты $\text{P2Y}_{12}^{-/-}$ мышей не способны нормально агрегировать в ответ на введение ADP. Они сохраняют способность изменять свою форму и активацию PLC, но это связано с нормальной работой P2Y_1 рецептора. У таких тромбоцитов наблюдается снижение способности к ингибированию формирования cAMP в ответ на ADP [42].

По сравнению с коллагеном и тромбином, ADP считается более слабым активатором: он не может вызвать появление прокоагулянтной поверхности у тромбоцитов, а может только давать вклад в работу сильных активаторов [70]. Активация тромбоцита с помощью ADP приводит к выбросу около 6% содержащихся в нём плотных гранул [71], синтезу и выбросу около 10^{-10} нмоль тромбоксана A_2 , причём характерное время его синтеза равно примерно 100 секундам [72], изменению его формы, появлению способности у тромбоцита к агрегации.

Попадая в плазму, ADP гидролизруется до AMP (период его полураспада 10-15 мин), что влияет на количество тромбоцитов, которое он сможет активировать. Гидролиз ADP в плазме происходит под действием ADПазы, которая вырабатывается лимфоцитами и клетками эндотелия [73]. Также в гидролизе ADP принимают участие и эритроциты [74]. Этот процесс необходим для предотвращения появления в крови спонтанно активированных тромбоцитов.

В настоящее время остаётся неизвестным полный каскад внутриклеточных событий, приводящий к изменению формы тромбоцита, повышению его уровня Ca^{2+} при активации тромбоцита от ADP. Неясно также, почему этот каскад вызывает секрецию только TXA_2 , но практически не вызывает выброса плотных гранул. До сих пор остаётся неизученным в деталях, как изменится ответ тромбоцита, при его одновременной активацией с помощью ADP и другого агониста (TXA_2 , тромбина, коллагена).

4. АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТРОМБОКСАНА A_2 .

TXA_2 также относится к разряду слабых активаторов тромбоцитов, причем считается ещё более слабым активатором чем ADP. TXA_2 начинает синтезироваться тромбоцитами при их активации [9]. При добавлении TXA_2 (или его стабильного аналога U46619) *in vitro* тромбоциты изменяют свою форму, начинают агрегировать и секретировать активирующие вещества, происходит фосфорилирование их белков, у них повышается уровень внутриклеточного Ca^{2+} [61]. Причём тромбоциты агрегируют тем сильнее,

чем больше тромбоксана A_2 было добавлено [75]. Таким образом, TXA_2 , синтезируемый активировавшимися тромбоцитами, может увеличивать количество активированных тромбоцитов.

ТР-рецептор – единственный рецептор к TXA_2 на поверхности тромбоцитов. Он ассоциирован с G_q и $G_{12/13}$ белками, передача сигнала к ним от рецепторов и дальнейшие цепи химических превращений полностью идентичны описанным выше [42]. Когда тромбоцит активируется от воздействия сильного активатора (тромбина или коллагена), количество этих рецепторов на поверхности тромбоцита увеличивается, т.к. эти рецепторы содержатся в его α -гранулах [64].

У ТР^{-/-} мышей наблюдалось увеличение времени кровотечения. Их тромбоциты были неспособны агрегировать в ответ на введение TXA_2 , а также увеличивалось время их агрегации в ответ на коллаген. При добавлении аспирина (блокирует синтез TXA_2) *in vitro* происходит ухудшение ответа тромбоцитов на ADP и коллаген. Нарушение ответа на тромбин выглядит как сдвиг кривой концентрация/агрегация, что указывает на то, что синтез TXA_2 лишь поддерживает активацию тромбоцитов от тромбина, но он не является необходимым для этого процесса [42].

Активация тромбоцита с помощью тромбоксана A_2 не приводит к синтезу и выбросу тромбоксана A_2 [75], но один тромбоцит выбрасывает около 10^{-8} нмоль ADP, содержащегося в плотных гранулах, причём характерное время их выброса равно примерно 5 с [76, 77].

В присутствии тромбоцитов, тромбоксан A_2 гидролизруется до тромбоксана B_2 (период его полураспада около 30 с) [78], что сильно ограничивает область его распространения и количество тромбоцитов, которое он сможет активировать.

Сейчас сигнальный каскад, вызываемый активацией тромбоцита тромбоксаном A_2 , охарактеризован далеко не полностью. Непонятно, почему при активации тромбоцита тромбоксаном A_2 не начинается синтез TXA_2 , хотя внутриклеточные события при этом полностью идентичны случаю активации от ADP. Возможно, короткоживущий TXA_2 играет роль слабого инициатора процесса активации тромбоцитов, в то время как более долгоживущий ADP усиливает этот процесс и расширяет пространство активации тромбоцитов.

5. АКТИВАЦИЯ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ АТР.

Плотные гранулы тромбоцитов содержат не только ADP, но и АТР (причём АТР в них примерно в два раза больше [79]). Также АТР выбрасывается из клеток эндотелия при их повреждении. На поверхности тромбоцитов в значительных количествах экспонируется рецептор $P2X_1$, который представляет собой кальциевый канал, открывающийся при взаимодействии с АТР. Изучение этого рецептора сильно осложняется его быстрой (за несколько сотен миллисекунд) десенситизацией, которую вызывают даже очень маленькие концентрации АТР. В случае полного удаления АТР, восстановление этого рецептора происходит примерно за 5 мин [80]. Активация рецептора $P2X_1$ приводит к изменению формы тромбоцита, быстрой и обратимой централизации его секреторных гранул, однако агрегации тромбоцитов при этом не наблюдается [81, 82]. Этот рецептор играет вспомогательную роль при активации тромбоцитов от коллагена, тромбина, ADP и TXA_2 . Очень быстрая активация тромбоцитов при активации этого рецептора важна в случае больших скоростей течения крови, из-за задержки появления других активаторов [82–88].

Удаление этого рецептора у мышей приводило к увеличению времени кровотечения и снижению агрегации в ответ на низкие концентрации коллагена. При больших скоростях течения крови (скорость сдвига 6000 c^{-1}), в случае нокаута этого рецептора, размер тромба уменьшался на 30%. Также такие мыши демонстрировали устойчивость к тромбоэмболии при введении коллагена и адреналина [84].

При усилении экспонирования этого рецептора у мышей увеличивалась секреция и агрегация тромбоцитов, вызванная малыми концентрациями коллагена, TXA_2 , несмотря на нормальный ответ на ADP и тромбин [89].

Активация тромбоцита с помощью тромбосана A_2 приводит к выбросу одним тромбоцитом около 2×10^{-8} нмоль АТР, причём характерное время его выброса равно примерно 5 с [76, 77, 79].

Попадая в плазму, АТР гидролизует до ADP (период его полураспада 10-15 мин), и поэтому, он также может вносить вклад в активацию тромбоцитов через P2Y_1 и P2Y_{12} рецепторы. Гидролиз АТР в плазме происходит под действием АТРазы, которая вырабатывается лимфоцитами и клетками эндотелия [73].

Сигнальный каскад, опосредуемый при активации рецептора P2X_1 , изучен очень плохо, неизвестно вызывает ли АТР секрецию тромбосана A_2 . Возможно, АТР играет лишь вспомогательную роль в активации тромбоцитов, но тогда не понятно, зачем так много АТР содержится в плотных гранулах. К тому же, время гидролиза АТР в крови слишком велико, для того, чтобы внести заметное увеличение числа тромбоцитов, активированных от ADP, за счёт его дополнением АТР.

6. МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ.

Как описано выше, при появлении активаторов тромбоциты меняют форму, слипаются и образуют тромб. В отсутствие повреждения в норме активация тромбоцитов подавляется веществами, выделяющимися из здорового эндотелия. Существует несколько сильных ингибирующих сигналов, которые препятствуют нежелательной активации тромбоцитов и ограничивают размер тромба в месте повреждения сосуда. К ним относятся NO и простагландин (PGI_2) – сильные регуляторы, которые в состоянии препятствовать адгезии тромбоцитов, активации, агрегации, секреции и изменению формы тромбоцитов [90].

6.1. Простагландин.

Простагландин исходно обнаружили при изучении неустойчивого синтеза эйкозаноидов стенкой сосуда [91]. В дальнейшем было установлено [92, 93], что под действием фосфолипазы A_2 происходит высвобождение арахидоновой кислоты, которая под действием циклооксигеназы превращается в простагландин H_2 (PGH_2). Последний под действием PGI_2 -синтазы превращается в PGI_2 . Больше всего PGI_2 синтезируется в эндотелии, и уровень этого синтеза падает при движении к внешней оболочке сосуда [94]. Таким образом, клетки эндотелия играют основную роль в ингибировании активации тромбоцитов. Период полураспада PGI_2 равен, примерно, 60 мин, но эффект ингибирования активации тромбоцитов исчезает уже через 30 мин после его внутривенного введения. Также было показано, что PGI_2 способен вернуть активированный тромбоцит обратно в неактивированное состояние как *in vivo*, так и *in vitro* [95].

Для поддержания тромбоцита в неактивированном состоянии на его поверхности присутствует рецептор IP , связанный с G_s белками [96]. Его активация стимулирует аденилатциклазу, что приводит к усилению

синтеза сАМР в тромбоците. Увеличение количества сАМР в клетке приводит к активации сАМР зависимой протеинкиназы А (РКА) [90], которая фосфорилирует многие регуляторные белки, включая VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). Кроме того, РКА регулирует уровень Ca^{2+} , непосредственно фосфорилируя IP3-рецепторы и PMCAs, таким образом, способствуя подавлению высвобождения Ca^{2+} и активному выкачиванию Ca^{2+} во внеклеточную среду соответственно [97]. Механизм фосфорилирования IP3-рецепторов изучен недостаточно, так как неизвестны сайты фосфорилирования [96]. Также это приводит к ингибированию выброса плотных гранул [98]. РКА имеет и другие субстраты, большинство из которых до сих пор не известны [96]. Фосфорилированный VASP препятствует реорганизации цитоскелета, сопровождающейся агрегацией тромбоцитов [99].

Было показано, что синтез PGI_2 и синтез TXA_2 являются зависимыми друг от друга, а также, что PGI_2 снижает активацию тромбоцитов с помощью TXA_2 [100].

6.2. Оксид азота.

NO может быть синтезирован многими типами клеток, в том числе тромбоцитами, клетками эндотелия и макрофагами [101]. Реакцию образования NO из L-аргинина катализируют синтазы оксида азота (NOS, nitric oxide synthases) [102, 103]. NO – незаряженный радикал, который, примерно, в 70 раз лучше растворяется в гидрофобных средах, чем вода, что позволяет ему легко диффундировать через клеточные компартменты. Но, тем не менее, время его жизни достаточно мало, что мешает его дистантному распространению [103]. После того как NO попадает в клетку, он стимулирует гуанилатциклазу GC, катализирующую реакцию синтеза cGMP из GTP [104].

Существует три изоформы NOS, которые можно охарактеризовать по месту их синтеза, способу экспрессии и зависимости от Ca^{2+} : нейрональные nNOS (NOS1), индуцибельные iNOS (NOS2), находящиеся в клетках гладких мышц, нейтрофилах, макрофагах, и эндотелиальные eNOS (NOS3) [105]. Из этих трёх изоформ только nNOS и eNOS сильно зависят от Ca^{2+} , и их активность регулируется белком кальмодулином. Изоформа iNOS зависит от Ca^{2+} в гораздо меньшей степени, и её активность регулируется на уровне транскрипции, стимулируемой цитокинами и эндотоксинами бактерий [95].

NO является одним из основных регуляторов процесса гемостаза, он способен различными путями ингибировать активацию и агрегацию тромбоцитов. Повышение уровня активности растворимой GC (sGC), стимулированной NO, приводит к падению уровня внутриклеточного Ca^{2+} . Также NO способен стимулировать фосфорилирование рецепторов к TXA_2 , тем самым предотвращая активацию тромбоцитов TXA_2 [106]. Кроме того, в последнее время было показано, что NO также определенным образом влияет на активацию интегрин $\alpha_2\beta_1$ [107]. Хотя NO оказывает тормозящее действие на агрегацию тромбоцитов при высоких его концентрациях, он скорее стимулирует секрецию гранул, действуя через cGMP-зависимый путь при низких концентрациях (бифазный эффект) *in vivo* [108].

Сейчас уже установлено, что тромбоциты способны синтезировать и секретировать NO, причём при активации этот процесс усиливается, что может регулировать рост тромба [109]. Показано, что синтез NO может достигать уровней синтеза NO клетками эндотелия [110]. Причём неактивированные тромбоциты синтезируют NO до 20 нМ, а при их активации это число возрастает до 5-15 мкМ [109].

Таким образом, спонтанная клеточная активация подавляется как оксидом азота, так и простаглицлином. Также эти вещества способны в сильной степени регулировать рост гемостатической пробки в месте повреждения, регулируя соотношения сигналов активации и ингибирования, и тем самым предотвращая активацию излишних тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. На первом этапе активации тромбоцит, остановленный в месте повреждения с помощью непрямого рецептора GPIb, взаимодействует с коллагеном, который связываясь с рецепторами GPVI и $\alpha_2\beta_1$ вызывает активацию PLC γ 2, что приводит к синтезу тромбоксана A_2 , активации интегринов, повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и выбросу гранул, содержащихся в тромбоцитах. Выброс этих активаторов способствует распространению волны активации тромбоцитов. Тромбин связывается с рецепторами PAR1 и PAR4, которые сопряжены с белками G_i , G_q и $G_{12/13}$, и это приводит к синтезу тромбоксана A_2 , активации интегринов, повышению концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , выбросу гранул, изменению формы тромбоцита, а также ингибированию аденилатциклазы, что приводит к понижению уровня cAMP в клетке. В плотных гранулах тромбоцита, выбрасываемых им при активации, содержатся ADP и ATP. ADP, связываясь с рецепторами P2Y $_1$ и P2Y $_{12}$, вызывает активацию тромбоцита, изменение его формы, повышению концентрации его внутриклеточного Ca^{2+} , синтезу тромбоксана A_2 и выбросу около 6% содержащихся в нём плотных гранул. Аналогично ADP действует тромбоксан A_2 , который активирует тромбоцит, связываясь с TP-рецептором, но он не способствует синтезу самого TXA $_2$. ATP поддерживает и ускоряет активацию тромбоцитов. В ингибировании тромбоцитов, в основном, принимают участие клетки эндотелия сосудов. Они, вместе с тромбоцитами, вырабатывают такие ингибиторы, как PGI $_2$ и NO, которые вызывают снижение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , что ингибирует активацию тромбоцитов.

Суммируя вышесказанное, на сегодняшний день процесс роста тромбоцитарного агрегата для предотвращения кровотечения выглядит следующим образом: при повреждении сосуда на его стенке обнажается коллаген, который является как субстратом, так и сильным активатором, и приводит ко всем ответам тромбоцитов, включающих агрегацию, прокоагулянтную активность и выброс дополнительных слабых активаторов. Прокоагулянтная активность тромбоцита способствует активации системы свертывания крови, в результате чего появляется тромбин, который тоже является сильным активатором и приводит к тем же ответам, что и коллаген. Однако, в отличие от коллагена, он представляет собой растворимый белок, который может активировать не только сидящие на стенке клетки, но и тромбоциты в любых точках агрегата. Слабые активаторы, такие как ADP, ATP и TXA $_2$ приводят к активации других неактивированных тромбоцитов, которые начинают агрегировать к месту повреждения и секретировать слабые активаторы. При этом эндотелий сосудов постоянно вырабатывает такие ингибиторы активации тромбоцитов, как NO и PGI $_2$, которые способствуют ингибированию активации тромбоцитов в норме, что предотвращает спонтанную активацию тромбоцитов и в целом контролирует рост тромбоцитарного сгустка.

Несмотря на то, что картина активации тромбоцитов в процессе роста тромба в последние годы дополнилась многочисленными важными деталями, в ней остались существенные “белые пятна”. Для ряда рецепторов (например, P2X $_1$) не очень ясны функции; для других (например, CLEC-2)

не определены ни активаторы, ни функции; а также нет уверенности в идентификации всех ключевых рецепторов. Вопрос взаимодействия активаторов и рецепторов между собой также далек от ясности: почему у тромбоцита так много активаторов, причем некоторые из них практически аналогичны (ADP и тромбоксан A_2) и как они взаимодействуют, почему у этих активаторов есть несколько рецепторов с похожей сигнализацией (PAR1 и PAR4), да и сама комбинация PAR-рецепторов с гликопротеином GPIb, как рецептором тромбина, остается загадочной. Все сигнальные пути изучены очень слабо: пока ещё неизвестны все связи между активаторами и вызываемыми ими изменениями в клетке, её ответом на действие этих активаторов, взаимодействия в сети сигнализации. Наконец, подавляющее большинство информации о рецепторах и путях сигнализации тромбоцитов было получено в опытах *in vitro*, на выделенных клетках и с помощью фармакологических ингибиторов (т.к. тромбоциты мало подходят для генетических манипуляций). Лишь малая часть этой информации была подтверждена на нокаутных мышах. Поэтому даже имеющийся массив знаний о тромбоцитарной сигнализации нуждается в дальнейшей проверке в условиях, близких к *in vivo*. Разрешение этих вопросов является актуальным как для фундаментальной клеточной биологии, так и для разработки новых лекарственных препаратов, методов диагностики и способов лечения нарушений системы гемостаза.

Данная работа поддержана грантом РФФИ 12-04-31401.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dayananda K.M., Singh I., Mondal N., Neelamegham S. (2010) *Blood*, **116**, 3990–3998.
2. Ruggeri Z.M., Orje J.N., Habermann R., Federici A.B., Reininger A.J. (2006) *Blood*, **108**, 1903–1910.
3. Reininger A.J. (2008) *Haemophilia*, **14**, 11–26.
4. Мазуров А.В. (2011) Физиология и патология тромбоцитов, Литтерра, М.
5. Brass L.F., Zhu L., Stalker T.J. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 3385–3392.
6. Jackson S.P. (2007) *Blood*, **109**, 5087–5095.
7. Gibbins J.M. (2004) *J. Cell Sci.*, **117**, 3415–3425.
8. Nieswandt B., Watson S.P. (2003) *Blood*, **102**, 449–461.
9. Versteeg H.H., Heemskerk J.W.M., Levi M., Reitsma P.H. (2013) *Physiol. Rev.*, **93**, 327–358.
10. Watson S.P., Gibbins J. (1998) *Immunol. Today*, **19**, 260–264.
11. Jung S.M., Moroi M. (2004) *Thromb. Res.*, **114**, 221–233.
12. Pasquet J.M., Quek L., Pasquet S., Poole A., Matthews J.R., Lowell C., Watson S.P. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 28526–28531.
13. Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. (2009) *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 1057–1066.
14. Liou J., Kim M.L., Heo W.D., Jones J.T., Myers J.W., Ferrel J.E.Jr., Meyer T. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1235–1241.
15. Braun A., Varga-Szabo D., Kleinschnitz C., Pleines I., Bender M., Austinat M., Bosl M., Stoll G., Nieswandt B. (2009) *Blood*, **113**, 2056–2063.
16. Harper M.T., Poole A.W. (2009) *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 454–462.

17. Stefanini L., Roden R.C., Bergmeier W. (2009) *Blood*, **114**, 2506–2514.
18. Chrzanowska-Wodnicka M., Smyth S.S., Schoenwaelder S.M., Fischer T.H., White G.C. (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**, 680–687.
19. Shimaoka M., Takagi J., Springer T.A. (2002) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **31**, 485–516.
20. Crittenden J.R., Bergmeier W., Zhang Y., Piffath C.L., Liang Y., Wagner D.D., Housman D.E., Graybiel A.M. (2004) *Nat. Med.*, **10**, 982–986.
21. Lafuente E.M., van Puijenbroek A.A., Krause M., Carman C.V., Freeman G.J., Berezovskaya A., Constantine E., Springer T.A., Gertler F.B., Boussiotis V.A. (2004) *Dev. Cell.*, **7**, 585–595.
22. Watson S.P., Herbert J.M., Pollitt A.Y. (2010) *J. Thromb. Haemost.*, **8**, 1456–1467.
23. Suzuki-Inoue K., Fuller G.L., Garcia A., Eble J.A., Pohlmann S., Inoue O., Gartner T.K., Hughan S.C., Pearce A.C., Laing G.D., Theakston R.D., Schweighogger E., Zitzmann N., Morita T., Tybulewicz V.L., Ozaki Y., Watson S.P. (2006) *Blood*, **107**, 542–549.
24. Stegner D., Nieswandt B. (2011) *J. Mol. Med.*, **89**, 109–121.
25. Dale G.L. (2005) *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 2185–2192.
26. Heemskerk J.W., Bevers E.M., Lindhout T. (2002) *Thromb. Haemost.*, **88**, 186–193.
27. Sims P.J., Wiedmer T., Esmon C.T., Weiss H.J., Shattil S.J. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 17049–17057.
28. Gilio K., Harper M.T., Cosemans J.M., Konopatskaya O., Munnix I.C., Prinzen L., Leitges M., Liu Q., Molkentin J.D., Heemskerk J.W., Poole A.W. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 23410–23419.
29. Topalov N.N., Kotova Y.N., Vasil'ev S.A., Pantelev M.A. (2012) *Br. J. Haematol.*, **157**, 105–115.
30. Jung S.M., Moroi M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 8016–8026.
31. Ni H., Ramakrishnan V., Ruggeri Z.M., Papalia J.M., Phillips D.R., Wagner D.D. (2001) *Blood*, **98**, 368–373.
32. Lockyer S., Okuyama K., Begum S., Le S., Sun B., Watanabe T., Matsumoto Y., Yoshitake M., Kambayashi J., Tandon N.N. (2006) *Thromb. Res.*, **118**, 371–380.
33. Rivera J., Lozano M.L., Navarro-Nunez L., Vicente V. (2009) *Haematol.*, **94**, 700–711.
34. Cosemans J.M.E.M., Iserbyt B.F., Deckmyn H., Heemskerk J.W.M. (2008) *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 1253–1261.
35. Moes M., Rodius S., Coleman S.J., Monkley S.J., Goormaghtigh E., Tremuth L., Kox C., van der Holst P.P.G., Critchley D.R., Kieffer N. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 17280–17288.
36. Schwartz M.A., Ginsberg M.H. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 65–68.
37. Inoue O., Suzuki-Inoue K., Dean W.L., Frampton J., Watson S.P. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 769–780.
38. Consonni A., Cipolla L., Guidetti G., Canobbio I., Ciraolo E., Hirsch E., Falasca M., Okigaki M., Balduni C., Torti M. (2012) *Blood*, **119**, 847–856.
39. Kamata T., Takada Y. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 26006–26010.
40. Chen H., Kahn M.L. (2003) *Mol. Cell Biol.*, **23**, 4764–4777.
41. Vu T-K.H., Hung D.T., Wheaton V.I., Coughlin S.R. (1991) *Cell*, **64**, 1057–1068.
42. Stalker T.J., Newman D.K., Peisong M., Wannemacher K.M., Brass L.F. (2012) *Handb. Exp. Pharmacol.*, **210**, 59–85.
43. Holmsen H. (1994) *Eur. J. Clin. Invest.*, **24**, 3–8.
44. Coughlin S.R. (2005) *J. Thromb. Hemost.*, **3**, 1800–1814.

45. *Bahau W.F.* (2007) in *Platelets*, Second edition (Michelson A.D., ed.), Academic Press, Elsevier Inc, Amsterdam, Boston, Heidelberg et al., pp. 179–200.
46. *Shantsila E., Watson T., Lip G.Y.H.* (2008) in *Platelets in hematologic and cardiovascular disorders* (Gesele P., Fuster V., Lopez J.A. Page C.P., Vermynen J., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 125–146.
47. *Woulfe D.S.* (2005) *J. Thromb. Hemost.*, **3**, 2193–2200.
48. *De Candia E.* (2012) *Thromb. Res.*, **129**, 250–256.
49. *Voss B., McLaughlin J.N., Holinstat M., Zent R., Hamm H.E.* (2007) *Mol. Pharm.*, **71**, 1399–1406.
50. *Harper M.T., Poole A.W.* (2011) *J. Thromb. Hemost.*, **9**, 1599–1607.
51. *Siljander P.R., Munnix I.C., Smethurst P.A., Deckmyn H., Lindhout T., Ouwehand W.H., Farndale R.W., Heemskerk J.W.* (2004) *Blood*, **103**, 1333–1341.
52. *Li Z., Delaney M.K., O'Brien K.A., Du X.* (2010) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **30**, 2341–2349.
53. *Crawley J.T.B., Zanardelli S., Chion C.K.N.K., Lane D.A.* (2007) *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 95–101.
54. *Kahn M.L., Nakanishi-Matsui M., Shapiro M.J., Ishihara H., Coughlin S.R.* (1999) *J. Clin. Invest.*, **103**, 879–887.
55. *Bergmeier W., Stefanini L.* (2009) *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 187–190.
56. *Bauer M., Retzer M., Wilde J.I., Maschberger P., Essler M., Aepfelbacher M., Watson S.P., Siess W.* (1999) *Blood*, **94**, 1665–1672.
57. *Paul B.Z., Daniel J.L., Kunapuli S.P.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 28293–28300.
58. *Resendiz J.C., Kroll M.H., Lassila R.* (2007) *J. Thromb. Haemost.*, **5**, 2484–2493.
59. *Wu C.C., Wu S.Y., Liao C.Y., Teng C.M., Wu Y.C., Kuo S.C.* (2010) *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 643–658.
60. *Andrews R.K., Brendt M.C., Lopez J.A.* (2007) in *Platelets*, Second edition (Michelson A.D., ed.), Academic Press, Elsevier Inc, Amsterdam, Boston, Heidelberg et al., pp.145–163.
61. *Jennings L.K.* (2009) *Thromb. Haemost.*, **102**, 248–257.
62. *Gear A.R.L.* (1994) *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 285–294.
63. *Offermanns S., Toombs C.F., Hu Y.H., Simon M.I.* (1997) *Nature*, **389**, 183–186.
64. *Nurden P., Poujol C., Nurden A.T.* (1997) *Baillieres Clin. Haematol.*, **10**, 1–27.
65. *Haberstock-Debic H., Andre P., Mills S., Phillips D.R., Conley P.B.* (2011) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **339**, 54–61.
66. *Gachet C.* (2001) *Thromb. Haemost.*, **86**, 222–232.
67. *Cattaneo M.* (2007) in *Platelets*, Second edition (Michelson A.D., ed.), Academic Press, Elsevier Inc, Amsterdam, Boston, Heidelberg et al., pp. 201–220.
68. *Cattaneo M.* (2007) in *Platelets*, Second edition, (Michelson A.D., ed.), Academic Press, Elsevier Inc, Amsterdam, Boston, Heidelberg et al., pp. 3552–3560.
69. *Brass L.F., Stalker T.J.* (2008) in *Platelets in hematologic and cardiovascular disorders*, (Gesele P., Fuster V., Lopez J.A. Page C.P., Vermynen J., eds.), Cambridge University Press, pp. 37–52.
70. *Kotova Y.N., Ataullakhanov F.I., Panteleev M.A.* (2008) *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 1603–1605.
71. *Lantz N., Hechler B., Ravanat C., Cazenave J.P., Gachet C.* (2007) *Thromb. Haemost.*, **98**, 1145–1147.

72. *De Caterina R., Giannessi D., Gazzetti P., Bernini W.* (1984) *J. Nucl. Med. Allied. Sci.*, **28**, 185–196.
73. *Coade S.B., Pearson J.D.* (1989) *Circ. Res.*, **65**, 531–537.
74. *Luthje J., Schomburg A., Ogilvie A.* (1988) *Eur. J. Biochem.*, **175**, 285–289.
75. *Nakano T., Hanasaki K., Arita H.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 5400–5406.
76. *Beigi R., Kobatake E., Aizawa M., Dubyak G.R.* (1999) *Am. J. Physiol.*, **276**, 267–278.
77. *Holmsen H., Storm E., Day H.J.* (1972) *Anal. Biochem.*, **46**, 489–501.
78. *Smith J.B., Ingerman C., Silver M.J.* (1976) *J. Clin. Invest.*, **58**, 1119–1122.
79. *Holmsen H., Day H.J., Setkowsky C.A.* (1972) *Biochem. J.*, **129**, 67–82.
80. *Surprenant A., Buell G., North R.A.* (1995) *Trends. Neurosci.*, **18**, 224–229.
81. *Vial C., Pitt S.J., Roberts J., Rolf M.G., Mahaut-Smith M.P., Evans R.J.* (2003) *Blood*, **102**, 3646–3651.
82. *Toth-Zsamboki E., Oury C., Cornelissen H., De Vos R., Vermynen J., Hoylaerts M.F.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 46661–46667.
83. *Oury C., Toth-Zsamboki E., Thys C., Tytgat J., Vermynen J., Hoylaerts M.F.* (2001) *Thromb. Haemost.*, **86**, 1264–1271.
84. *Hechler B., Lenain N., Marchese P., Vial C., Heim V., Freund M., Cazenave J.P., Cattaneo M., Ruggeri Z.M., Evans R., Gachet C.* (2003) *J. Exp. Med.*, **198**, 661–667.
85. *Fung C.Y., Brearley C.A., Farndale R.W., Mahaut-Smith M.P.* (2005) *Thromb. Haemost.*, **94**, 37–40.
86. *Erhardt J.A., Toomey J.R., Douglas S.A., Johns D.G.* (2006) *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 882–890.
87. *Fung C.Y., Brearley C.A., Farndale R.W., Mahaut-Smith M.P.* (2007) *Thromb. Haemost.*, **5**, 910–917.
88. *Hu H., Hoylaerts M.F.* (2010) *Platelets*, **21**, 153–166.
89. *Oury C., Kuijpers M.J., Toth-Zsamboki E., Bonnefoy A., Danloy S., Vreys I., Feijge M.A., De Vos R., Vermynen J., Heemskerk J.W., Hoylaerts M.F.* (2003) *Blood*, **101**, 3969–3976.
90. *Rex S., Freedman N.J.* (2006) *Platelets*, 251–279.
91. *Moncada S., Gryglewski R., Bunting S., Vane J.R.* (1976) *Nature*, **263**, 663–665.
92. *Lim H., Dey S.K.* (2002) *Endocrinology*, **143**, 3207–3210.
93. *Moncada S., Higgs E.A., Vane J.R.* (1977) *Lancet.*, **1**, 18–20.
94. *Namba T., Oida H., Sugimoto Y., Kakizuka A., Negishi M., Ichikawa A., Narumiya S.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 9986–9992.
95. *Jin R.C., Voetsch B., Loscalzo J.* (2005) *Microcirculation*, **12**, 247–258.
96. *Smolenski A.* (2012) *J. Thromb. Haemost.*, **10**, 167–176.
97. *Cavallini L., Coassin M., Borean A., Alexandre A.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 5545–5551.
98. *Aszodi A., Pfeifer A., Ahmad M., Glauner M., Zhou X.H., Ny L., Andersson K.E., Kehrel B., Offermanns S., Fassler R.* (1999) *Embo. J.*, **18**, 37–48.
99. *Harbeck B., Huttelmaier S., Schluter K., Jockusch B.M., Illenberger S.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 30817–30825.
100. *Cheng Y., Austin S.C., Rocca B., Koller B.H., Coffman T.M., Grosser T., Lawson J.A., FitzGerald G.A.* (2002) *Science*, **296**, 539–541.
101. *Giustarini D., Milzani A., Colombo R., Dalle-Donne I., Rossi R.* (2003) *Clin. Chim. Acta.*, **330**, 85–98.
102. *Marletta M.A.* (1994) *Cell*, **78**, 927–930.
103. *Ignarro L.J.* (1989) *Circ. Res.*, **65**, 1–21.
104. *Murad F., Mittal C.K., Arnold W.P., Braughler J.M.* (1979) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **9**, 175–204.

105. *Krumenacker J.S., Hanafy K.A., Murad F.* (2004) *Brain. Res. Bull.*, **62**, 505–515.
106. *Wang G.R., Zhu Y., Halushka P.V., Lincoln T.M., Mendelsohn M.E.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 4888–4893.
107. *Roberts W., Riba R., Homer-Vanniasinkam S., Farndale R.W., Naseem K.M.* (2008) *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 2175–2185.
108. *Blackmore P.F.* (2011) *Thromb. Res.*, **127**, 8–14.
109. *Freedman J.E., Loscalzo J., Barnard M.R., Alpert C., Keaney J.F., Michelson A.D.* (1997) *J. Clin. Invest.*, **100**, 350–356.
110. *Zhou Q., Hellermann G.R., Solomonson L.P.*, (1995) *Thromb. Res.*, **77**, 87-96.

Поступила: 10. 06. 2013.

ACTIVATORS, RECEPTORS AND SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS OF BLOOD PLATELETS

V.I. Shaturny¹, S.S. Shakhidzhanov¹, A.N. Sveshnikova^{1,2}, M.A. Panteleev^{1,2,3}

¹Department of Physics, Moscow State University, GSP-1, Leninskiye Gory, 1-2, Moscow, 119991 Russia; fax: 8-495-6128870; e-mail: msuff@mail.ru, schakhidjanov.s@yandex.ru

²The Laboratory of Physical Biochemistry of Blood, the National Research Center for Hematology, Noviy Zykovsky pr-d, 4; Moscow, 125167 Russia

³The Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology RAS, ul. Kosygina, 4, Moscow, 117977 Russia

Platelet participation in hemostatic plug formation requires transition into an activated state (or, rather, variety of states) upon action of agonists like ADP, thromboxane A₂, collagen, thrombin, and others. The mechanisms of action for different agonists, their receptors and signaling pathways associated with them, as well as the mechanisms of platelet response inhibition are the subject of the present review. Collagen exposed upon vessel wall damage induced initial platelet attachment and start of thrombus formation, which involves numerous processes such as aggregation, activation of integrins, granule secretion and increase of intracellular Ca²⁺. Thrombin, ADP, thromboxane A₂, and ATP activated platelets that were not initially in contact with the wall and induce additional secretion of activating substances. Vascular endothelium and secretory organs also affect platelet activation, producing both positive (adrenaline) and negative (prostacyclin, nitric oxide) regulators, thereby determining the relation of activation and inhibition signals, which plays a significant role in the formation of platelet aggregate under normal and pathological conditions. The pathways of platelet signaling are still incompletely understood, and their exploration presents an important objective both for basic cell biology and for the development of new drugs, the methods of diagnostics and of treatment of hemostasis disorders.

Key words: Platelets, collagen, thrombin, ADP, thromboxane A₂, PGI₂, nitric oxide.