ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ЦЕНТР ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИИ РАН

На правах рукописи

Артёменко Елена Олеговна

Взаимодействие адгезионных трансмембранных гликопротеинов с цитоскелетом в субпопуляциях активированных тромбоцитов

03.01.04 - биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор физ.-мат. наук Пантелеев Михаил Александрович

Москва 2017.

Оглавление

Введение
Глава I. Обзор литературы11
1.1 Тромбоциты и их роль в гемостазе11
1.2 Адгезия тромбоцитов: важнейшие адгезионные гликопротеины, их строение и функции
1.2.1 Гликопротеин Ib 16
1.2.2 Интегрины 18
1.2.3 Р-селектин
1.2.4 Фокальные контакты 21
1.3 Вклад интегринов в фокальную адгезию 23
 1.4 Цитоскелет тромбоцитов и его роль в адгезии и агрегации тромбоцитов
1.5 Прикрепление мембранных адгезионных белков к цитоскелету тромбоцитов и их связь с адгезией тромбоцитов
1.6 Субпопуляции активированных тромбоцитов
Задачи 39
Глава II. Результаты 40
2.1 Исследование прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов
2.2 Исследование белкового профиля тромбоцитов при их активации 45

2.3 Выявление механизма, ответственного за разрушение связи
адгезионных мембранных гликопротеинов с цитоскелетом
тромбоцита49
2.4 Анализ кинетики потери целостности мемораны тромооцита при
экспозиции ФС
2.5 Изучение влияния ингибиторов кальпаина на статус интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$
2.6 исследование влияния ингиоиторов кальпаина на деградацию ряда
цитоскелетных оелков, задеиствованных в прикреплении
мембранных гликопротеинов к цитоскелету 55
2.7 Анализ последовательности событий, протекающих при активации
тромбоцитов56
2.8 Анализ разрушения прикрепления меморанных тликопротеинов при
экспозиции ФС по поверхности клетки
2.9 Адгезия ФС-положительных тромбоцитов
Глава III. Обсуждение результатов
Заключение71
Выводы72
Глава IV. Материалы и методы73
4 1 Decumuna - 4 a forma - 72
4.1 Реактивы, использованные в работе /3
4.2 Оборудование, использованное в работе
4.3 Получение отмытых от белков плазмы тромбоцитов
4.4 Активация тромбоцитов74

4.5 Инкубация тромбоцитов с антителами
4.6 Проточная цитометрия75
4.7 Сортировка тромбоцитов75
4.8 Анализ разрушения прикрепления мембранных гликопротеитнов к цитоскелету тромбоцитов в субпопуляциях активированных тромбоцитов с помощью конфокальной микроскопии
4.9 Анализ сопротивляемости тромбоцитов, иммобилизованных на подложке, к воздействию потока
4.10 Анализ способности тромбоцитов прикрепляться в потоке
Список сокращений79
Список литературы:

Введение

Тромбоциты представляют собой безъядерные дискообразные клетки крови, которые являются одним из важнейших компонентов системы гемостаза, участвуя в формировании гемостатической пробки и остановке кровотечения, за счет процесса агрегации активированных тромбоцитов друг с другом и ускорения реакций плазменного свертывания, протекающих на поверхности прокоагулянтных тромбоцитов.

Адгезионные/агрегационные свойства тромбоцитов являются ключевыми для прикрепления тромбоцитов к поврежденной стенке сосуда и взаимодействия тромбоцитов друг с другом при формировании тромба. Адгезионные мембранные гликопротеины взаимодействуют с рядом цитоскелетных белков, которые опосредованно обеспечивают прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов. При физиологической агонист-индуцируемой активации тромбоцитов происходит формирование ими двух субпопуляций с принципиально различными свойствами. Одна из этих субпопуляций хорошо агрегирует и адгезирует к поверхности, в то время как другая плохо агрегирует и адгезирует, однако обладает значительно большей прокоагулянтной активностью за счет появления на ее мембране большего количества фосфатидилсерина (ΦC), что обеспечивает гораздо более эффективное связывание факторов свертывания с мембраной тромбоцита и ускорение скорости реакций свертывания в 10³-10⁵ раз. При активации тромбоцита происходит перестройка кардинальная его цитоскелета, как в ФС-отрицательной так и в ФС-положительной субпопуляциях, однако прикрепление мембранных гликопротеинов в этих субпопуляциях остается не исследовано. В ранних работах показано, что при определенных условиях активации тромбоцитов, способствующих экспозиции ФС на мембране тромбоцита, происходит протеолитическая деградация ряда цитоскелетных белков, прикрепление мембранных которые вовлечены В адгезионных гликопретеинов к цитоскелету. Однако, поскольку механизмы взаимодействия

мембранных адгезионных белков с цитоскелетом и процессы адгезии клеток крайне сложны и требуют участия порядка 100 различных молекул, неясно, насколько такая протеолитическая деградация способна влиять на прикрепление адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету, и какое влияние она оказывает на адгезионные свойства тромбоцитов.

<u>Целью</u> данной работы было исследование прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов и влияния разрушения прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов к цитоскелету на адгезионные свойства тромбоцитов.

В задачи исследования входило:

- 1. Разработать методику, позволяющую анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях клеток.
- 2. Исследовать прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в неактивированных и субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- Исследовать влияние деградации цитоскелетных белков на прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- Исследовать механизмы, контролирующие прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- Исследовать влияние деградации цитоскелетных белков, обеспечивающих прикрепление адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету, на адгезионные свойства тромбоцитов.

<u>Научная новизна.</u> В данной работе был разработан новый подход, основанный на обработке фиксированных тромбоцитов раствором неионного детергента, что позволяет высвободить из мембраны клетки несвязанные с цитоскелетом мембранные белки и анализировать прикрепление мембранных белков в субпопуляциях клеток с помощью проточной цитометрии или

конфокальной микроскопии в том случае, если мембранные белки были предварительно окрашены с помощью флуоресцентно-меченных антител. С использованием разработанного подхода было исследовано прикрепление основных адгезионных мембранных гликопротеинов тромбоцитов (интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, гликопротеин Ib и Р-селектин) К цитоскелету тромбоцитов В неактивированных и субпопуляциях активированных тромбоцитов, механизм, контролирующий это прикрепление, и влияние разрушения прикрепления к цитоскелету мембранных гликопротеинов на адгезионные свойства таких тромбоцитов.

Показано, что прикрепление адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету разрушено в субпопуляции ФС-положительных активированных тромбоцитов, в то время как в ФС-отрицательных активированных тромбоцитах и неактивированных тромбоцитах адгезионные мембранные гликопротеины прикреплены к цитоскелету. В работе показано также, что основным механизмом, который контролирует разрушение прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов, является активация кальций-зависимой протеазы кальпаина и выявлена регуляция таким механизмом способности тромбоцитов сопротивляться воздействию потока в условиях прикрепления их к подложке.

<u>Теоретическая и практическая значимость работы.</u> Результаты работы вносят свой вклад в понимание свойств субпопуляций активированных тромбоцитов и их физиологической роли в формировании тромба. Полученные результаты также частично объясняют низкую адгезивную способность ФС-положительных тромбоцитов.

<u>Методология и методы исследования.</u> Для выделения и очистки тромбоцитов от белков плазмы крови использовали комбинацию центрифугирования и гельфильтрации. Для разделения субпопуляций активированных тромбоцитов использовали их различное маркирование флуоресцентно-меченными антителами к мембранным гликопротеинам, причем дальнейший анализ таких клеток с

7

помощью проточной цитометрии позволил проанализировать каждую клетку в отдельности и, одновременно, обеспечил анализ сразу большого количества исследуемых тромбоцитов. Для изучения распределения мембранных гликопротеинов по поверхности тромбоцитов была использована конфокальная микроскопия.

Положения, выносимые на защиту:

- 1. Разработан новый подход с использованием проточной цитометрии, который позволяет анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету клетки.
- В неактивированных и субпопуляции активированных ΦС-отрицательных тромбоцитов ключевые адгезионные белки (интегрин α_{IIb}β₃ и гликопротеин Ib) прикреплены к цитоскелету клетки, в то время как в субпопуляции ΦСположительных тромбоцитов связь между адгезионными гликопротеинами и цитоскелетом разрушена.
- 3. Разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету происходит в результате протеолитический деградации ряда цитоскелетных белков (таких как филамин и талин), которые участвуют в прикреплении мембранных белков к цитоскелету тромбоцитов, протекающей в ФСположительных тромбоцитах.
- Основным механизмом, который контролирует разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету в ФС-положительных тромбоцитах, является перестройка цитоскелета тромбоцита в результате активации кальций-зависимой протеазы кальпаина.
- 5. Слабая сопротивляемость потоку ФС-положительных тромбоцитов (открепляются от иммобилизованного фибриногена при скорости сдвига около 500 с⁻¹) обясняется перестройкой их цитосклета в результате активации кальпаина, поскольку предварительно проинкубированные с

ингибитором кальпаина такие тромбоциты обладают значительно большей сопротивляемостью потоку (способны удерживаться на подложке даже при скорости сдвига порядка 9000 с⁻¹).

<u>Личный вклад автора</u> заключается в планировании и выполнении экспериментальной работы по анализу тромбоцитов с помощью проточной цитометрии, электрофореза и конфокальной микроскопии, а также в обработке и анализе полученных результатов, поиску и разбору данных литературы, в написании текста тезисов конференций и научных статей, в написании диссертации.

<u>Степень достоверности результатов.</u> Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается использованием необходимых современных биофизических и биохимических методов исследования, которые сейчас широко применяются для анализа живых клеток. Все эксперименты были проведены не менее 3-х раз на тромбоцитах, полученных из крови различных здоровых доноров. Данные в основном представлены в виде типичного результата эксперимента.

Апробация результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на 36th FEBS Congress (Torino, Italy, 25-30 June, 2011), XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto, Japan, 23-28 July, 2011), международной конференции Programmed Cell Death in Biology and Medicine, (Moscow, Russia, 4-5 June, 2012), 1st EUPLAN Platelet Conference (Maastricht, Netherlands, Sep 19-21, 2012), 6-ой Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии», Москва, 31 января-2 февраля 2013), XXIV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis (Amsterdam, Netherlands, June 29 - July 4, 2013), II Конгрессе гематологов России (Москва, Россия, 17-19 апреля, 2014), FEBS-EMBO 2014 Conference (Paris, France, 30 August – 4 September, 2014), International conference on bioorganic chemistry, biotechnology and bionanotechnology (Москва,

Россия, 15-19 сентября, 2014), XXV Congress of the International society on Thrombosis and Haemostasis (Toronto, Canada, June 20–25, 2015).

<u>Публикации.</u> По материалам диссертации опубликовано 18 публикаций. Статей в российских и международных рецензируемых журналах – 6 (рекомендованных ВАК РФ и включенных в базу цитирования Web of Science); публикаций в трудах российских и международных конференциий и съездов – 12.

Глава I. Обзор литературы

1.1 Тромбоциты и их роль в гемостазе

Тромбоциты представляют собой безъядерные дискообразные клетки крови, основной функцией которых является участие в процессе гемостаза [1]. Тромбоциты прикрепляются к поврежденному месту сосуда и, затем, агрегируя друг с другом, формируют тромб. Способность тромбоцитов избирательно прикрепляться к компонентам внеклеточного матрикса, экспонирующимся при повреждении стенки сосуда, называют адгезией. В то время как способность тромбоцитов прикрепляться друг к другу при формировании ими тромба называют агрегацией. Адгезия и агрегация тромбоцитов реализуются за счет наличия на их мембране специализированных гликопротеинов (молекул адгезии), которые взаимодействуют с цитоскелетом тромбоцитов и обеспечивают формирование прочного контакта клеток с поверхностью или друг с другом. Адгезию тромбоцитов к компонентам внеклеточного матрикса осуществляют точечные контакты, которые обычно называют фокальными или адгезионными контактами. Агрегация тромбоцитов осуществляется за счет взаимодействия мембранных рецепторов агрегации интегринов α_{шb}β₃ друг с другом на поверхности разных клеток, при этом взаимодействие между этими рецепторами происходит через молекулы белка плазмы фибриногена, которые служат как бы связующим мостиком между мембранными рецепторами двух агрегирующих тромбоцитов. В результате процессов адгезии и агрегации тромбоцитов в месте повреждения сосуда происходит формирование гемостатической бляшки, которая закрывает место повреждения и препятствует потере крови.

Первичная адгезия тромбоцитов к компонентам внеклеточного матрикса не требует их активации, в то время как агрегировать способны только активированные тромбоциты, у которых интегрин α_{IIb}β₃ переходит в активную конформацию, способную связывать фибриноген. Коллаген различных типов

является одним из наиболее важных компонентов внеклеточного матрикса, поскольку он обеспечивает не только первичное прикрепление тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке, но и последующую их активацию [2]. Начальная стадия прикрепления тромбоцитов к коллагену (Рис. 1) происходит с участием одного из белков плазмы фактора фон Виллебранда (ффВ), который связывается с коллагеном, комплексом гликопротеин Ib-V-IX (ГПІЬ-V-ІХ) и активной конформацией интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ [3, 4, 5, 6]. Затем формирование более стабильных взаимодействий происходит между тромбоцитом и поврежденной сосудистой стенкой (Рис. 1) за счет связывания коллагена с рецептором коллагена гликопротеином VI (ГПVI) и специфичным к коллагену интегрином $\alpha_2\beta_1$ [7, 8, 9]. В результате взаимодействия коллагена с ГПVI запускается тирозинкиназный сигнальный каскад (Рис. 1), который приводит к активации тромбоцита [2]. Исследования с использованием нокаутных мышей подтверждают предположение о том, что ГПVI является главным рецептором тромбоцитов, активирующимся от их взаимодействия с коллагеном [10, 11]. Предполагают также, что существуют и другие рецепторы к коллагену, однако их идентификация на данный момент не осуществлена [2].

Помимо активации тромбоцитов от взимодействия с коллагеном через ГПVI в активации тромбоцитов также участвует ГПІЬ, рецепторы семейства интегринов, рецепторы к тромбину и аденозиндифосфату (АДФ), что приводит к активации не только тирозинкиназного сигнального каскада, но и мобилизация кальция, а также активация G-белок опосредованной сигнализации. В результате активации тромбоцита происходит секреция содержимого его плотных и α гранул, изменение формы, что свидетельствует о кардинальной перестройке цитоскелета тромбоцита, и переход основного рецептора агрегации интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ в активную конформацию.



Рис. 1. Стадии формирования тромбоцитарного тромба на коллагене, экспонированном в местах повреждения сосудистой стенки [2]. Первоначальные взаимодействия тромбоцитов с субэндотелиальным коллагеном при высокой скорости потока, характерной для артериального кровотока, косвенным образом регулируются ффВ, который связывается с коллагеном на сосудистой стенке и гликопротеином Ib на тромбоцитах. Такие нестабильные взаимодействия способствуют временному прикреплению к сосудистой стенке и "качению" по ней тромбоцитов. ГПІЬ–опосредованная адгезия затем замещается более стабильным связыванием тромбоцита с коллагеном через ГПVI и интегрин $\alpha_2\beta_1$. В результате, стимулируется внутриклеточная сигнализация в тромбоцитах, что приводит к изменению их формы, распластыванию, секреции и высвобождению множества протромботических факторов. Аффинность интегринов усиливается в результате активации сигнализации тромбоцита и, в результате, приводит к фибриноген-зависимой агрегации тромбоцитов за счет связывания фибриногена с интегрином $\alpha_{IIb}\beta_3$ и адгезии, которая стабилизируется усиливающимся взаимодействием коллагена и ффВ с интегринами $\alpha_2\beta_1$ и $\alpha_{IIb}\beta_3$, соответственно. На рисунке обозначены: гликопротеин VI (glycoprotein VI, GPVI); комплекс гликопротеин Ib-V-IX (GPIb-V-XI complex); неактивированныя форма интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ (nonactivated integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$); активированная форма интерина $\alpha_{IIb}\beta_3$ (activated integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$); неактивированныя форма интегрина $\alpha_2\beta_1$ (non-activated integrin $\alpha_2\beta_1$); активированная форма интерина $\alpha_2\beta_1$ (activated integrin $\alpha_2\beta_1$); секреция гранул тромбоцита, содержащих АДФ, серотонин и тромбоксан A2 (secretion/release (ADP, serotonin, thromboxane A2); фибриноген (fibrinogen); фактор фон Виллебранда (von Willebrand factor); коллаген (collagen); временное прикрепление тромбоцитов (transient tethering); "качение" тромбоцитов (rolling); активация и секреция тромбоцитов (activation and secretion); образование тромба (thrombus formation); поток крови (flow).

В формировании стабильного тромба можно условно выделить три основных этапа: инициация роста тромба, продолжение роста тромба и стабилизация тромба, причем каждый ИЗ ЭТИХ этапов сопровождается определенными внутриклеточными сигналами в тромбоцитах [12]. Инициация роста тромба происходит, когда движущиеся в потоке крови тромбоциты прикрепляются к комплексу коллаген-ффВ, формирующемуся на поврежденной сосудистой стенке, и сразу же активируются. Это приводит к формированию монослоя тромбоцитов в месте повреждения, который является основой для последующей адгезии тромбоцитов друг к другу при формировании ими следующих слоев тромба и его роста.

Рост тромба происходит за счет прикрепления последующих тромбоцитов друг к другу и их активации. Такие активаторы тромбоцитов как тромбин, АДФ и тромбоксан A2 играют важную роль на этапе роста тромба, активируя тромбоциты за счет воздействия на соответствующие мембранные рецепторы, сопряженные с G-белками. Запускаемая при этом внутриклеточная сигнализация активирует основной рецептор агрегации интегрин α_{IIb}β₃ на поверхности тромбоцитов, приводя к тому, что тромбоциты становятся способны взаимодействовать друг с другом.

Стабилизация тромба – это финальное событие в формировании тромба, которое помогает укрепить тромб и предотвращает дисагрегацию тромбоцитов, за счет усиления внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах. Например, это происходит за счет сигнализации через интегрины и контакт-зависимой сигнализации через рецепторы, лиганды для которых локализованы на поверхности соседних клеток.

В конечном итоге, в результате всех этих процессов, формируется гемостатическая бляшка, которая состоит из активированных тромбоцитов, встроенных в фибриновую сетку, при этом такая сформированная структура

14

является достаточно стабильной, чтобы выдержать силы, возникающие при артериальном токе крови.

Довольно долго считали, что тромбоциты в тромбе все одинаковы, однако, последнее время все большее количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что растущий тромб неоднороден [13, 14, 15, 16, 17, 18]. Это означает, что в любой момент времени после травмы в тромбе существуют как полностью активированные тромбоциты, так и минимально активированные тромбоциты, не все из которых неизбежно будут полностью активированы в процессе дальнейшего роста тромба и его стабилизации [12].

Отрицательная регуляция активации тромбоцитов также существует и важна для предотвращения неконтролируемого тромбоза. Роль оксида азота II и простациклина (простагландин I2) хорошо изучена в ингибировании ими функции тромбоцитов [19, 20]. Активация тромбоцитов может также быть заингибирована проведением сигнала через адгезионную молекулу РЕСАМ-1 (CD31) [21, 22]. Димеризация РЕСАМ-1 способствует ее адгезивным свойствам, а олигомеризация приводит к запуску сигнального каскада [23]. Показано, что РЕСАМ-1 также ингибирует ГПІЬ-зависимую активацию тромбоцита [24].

Предполагают, что баланс между сигнализацией через активирующися адгезионные рецепторы и рецепторы для растворимых активирующих агонистов, а также сигнализацией для отрицательной регуляции активации тромбоцитов, регулирует порог активации, необходимый для формирования тромба, и может определять его размер и стабильность [2].

Поскольку способность к адгезии в месте повереждения стенки сосуда является одним из важнейших свойств тромбоцитов, то для понимания процесса инициации роста тромба необходимо детальное знание механизмов адгезии тромбоцитов и ее регуляции.

15

1.2 Адгезия тромбоцитов: важнейшие адгезионные гликопротеины, их строение и функции

Адгезия – это процесс взаимодействия между собой специфических мембранных гликопротеинов, расположенных на плазматических мембранах соприкасаются друг гликопротеинов клеток. которые с другом, или плазматической мембраны клетки и молекул внеклеточного матрикса. Такие молекулы межклеточной адгезии (связанные с плазматической мембраной специфические белки) обеспечивают механическое взаимодействие клеток друг с другом или с молекулами внеклеточного матрикса. Во многих случаях молекула адгезии способна взаимодействовать не с одним, а с несколькими лигандами, для чего служат разные сайты связывания на ее поверхности. Молекулы адгезии обычно расположены на мембране клетки кластерами и за счет этого образуют Основными участки многоцентрового связывания. адгезионными гликопротеинами тромбоцитов являются ГПІВ в составе комплекса ГПІВ-V-IX, рецепторы семейства интегринов и Р-селектин.

1.2.1 Гликопротеин Іb

ГПІb представляет собой комплекс одной субъединицы ГПІbα с двумя молекулами ГПІbβ, который образуется за счет формирования дисульфидных связей между околомембранной тандемной цистеиновой последовательностью ГПІbα и ГПІbβ [25]. При этом ГПІbα представляет собой 135 кДа белок, состоящий из N-концевого глобулярного домена, сиаломицинового ядра, внеклеточной околомембранной тандемной цистеиновой последовательности, трансмембранного домена, и цитоплазматического хвоста, который содержит сайты связывания для цитоплазматических сигнальных/цитоскелетных белков. ГПІbβ представляет собой значительно меньший по размеру белок (всего 26 кДа), чем ГПІbα, однако имеет схожие с ним структурные черты. ГПІbβ состоит из Nконцевого внеклеточного домена с двумя дисульфидными петлями, единственный цистеин располагается непосредственно вблизи мембраны и связывает ГШbβ с ГШbα, затем следует трансмембранный домен и небольшой, состоящий всего из 34 аминокислот, цитоплазматический домен. Также как ГШbа, ГШbβ содержит сайт гликозилирования. Такой сложный мультимер как ГШb помимо этого нековалентно ассоциирован с ГШX и ГПV, образуя комплекс ГШb-V-IX [26].

Для формирования начальных адгезионных контактов между таким компонентом внеклеточного матрикса как субэндотелиальный коллаген и тромбоцитами требуется участие ффВ, циркулирующего в кровотоке. Зависимые от ффВ взаимодействия с ГПІВ на мембране тромбоцита необходимы для затормаживания движения тромбоцита в потоке крови. Затем происходит формирование более стабильных связей между молекулами коллагена и тромбоцитом за счет связывания коллагена с рецептором коллагена ГПVI и интегрином $\alpha_2\beta_1$. Интегрин $\alpha_2\beta_1$ является первым идентифицированным рецептором к коллагену, который связывается с коллагеном в Mg²⁺-зависимой манере [27, 28, 29, 30, 31, 32]. В результате связывания интегрина $\alpha_2\beta_1$ с коллагеном не происходит активация тирозинкиназного сигнального каскада, который необходим тромбоцита. Предполагают, для активации что взаимодействие коллагена с интегрином α₂β₁ всего лишь стабилизирует контакт тромбоцита с поверхностью коллагена И позволяет ему затем провзаимодействовать с коллагеновым рецептором ГПVI, который уже способен активировать тирозинкиназную сигнализацию в тромбоците. Аффинность интегрина $\alpha_2\beta_1$ к коллагену после активации тромбоцита увеличивается посредством сигнализации, запускаемой при такой активации [33]. Это приводит к тому, что, в результате, активация тромбоцита опосредованно способствует стабилизации адгезионного контакта.

Взаимодействие комплекса ГПІЬ-V-IX с ффВ запускает сигнальный каскад, который приводит к секреции гранул тромбоцита и повышению аффинности

φφB c ГПІb-V-IX требует интегринов. Связывание комплексом наличия напряжения сдвига. При этом связывание ффВ с ГПІв приводит к активации тирозинкиназного сигнального каскада [34, 35, 36], кроме того, связывание φφΒ с ГПІЬ способно также стимулировать кальциевую сигнализацию [37, 38, 39, 40], активировать протеинкиназу С и протеинкиназу G [41, 42], фосфоинозитид-3-киназу [43, 44] и запускать перестройку цитоскелета [45, 46]. Связывание ффВ с ГПІ также способно непрямым путем регулировать аффинность интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ через стимуляцию секреции АДФ [47]. Также были показаны прямые взаимодействия комплекса ГПІЬ-V-IX с цитоскелетом [48].

ГПІ способен связывать не только ффВ, но и другие лиганды, такие как тромбин, фактор XII, фактор XI, высокомолекулярный кининоген, тромбоспондин и некоторые другие [49, 50]. ГПІЬ является мультифункциональным рецептором, который связывает протромботические И прокоагулянтные лиганды в сдвиг-активирующейся лиганд-связывающей [26]. универсальной области Отсутствие или дефицит ГПІЬ приводит к наследственным нарушениям свертываемости крови, синдрому Бернара-Сулье [51], причем все это совмещено с потерей сдвиг-зависимых взаимодействий тромбоцитов друг с другом [52], кроме того показано, что тромбоциты пациентов с синдромом Бернара-Сулье имеют сниженную прокоагулянтную функцию [53].

1.2.2 Интегрины

Интегрины структурно представляют собой гетеродимеры, состоящие из α и β субъединиц. Каждая субъединица однократно пронизывает мембрану и имеет большой внеклеточный домен (порядка 1600 аминокислот) и два небольших цитоплазматических домена (по 20-50 аминокислот).

Интегрины являются большим семейством мембранных рецепторов, одной из основных функций которых является взаимодействие клетки с молекулами внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, ламинин и др.). Именно адгезия рассматривается как основная или даже единственная функция интегринов. В дополнение к регуляции клеточной адгезии интегрины проводит сигнал через мембрану клетки к цитоскелету и активируют многие внутриклеточные сигнальные пути, причем проведение сигнала идет в обоих направлениях [54]. Конформационные изменения в структуре интеринов связывают эти функции посредством аллостерического равновесия.

Помимо своей сигнальной функции интегрины служат "механическими проводниками" от внеклеточного контакта снаружи клетки к цитоскелету внутри клетки. Все интегрины (за исключением $\alpha_6\beta_4$) связаны с актиновой системой микрофиламентов, которую интегрины также регулируют и модулируют. Специальные подмембранные белки, обеспечивающие связь цитоплазматического домена интегринов с цитоскелетом клетки, множественны и их взаимодействия с цитоплазматическим доменом рецептора и друг с другом являются весьма сложными.

Основной тромбоцитарный интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, представленный в большом количестве копий на тромбоцит, на мембране неактивированных тромбоцитов находится в неактивированном состоянии. При активации тромбоцитов интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ переходит в активную конформацию за счет сигнализации идущей изнутри тромбоцита, которая запускается в результате его активации (так называемая inside-out сигнализация). В своей активной конформации интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ способен связывать свой основной лиганд фибриноген, ффВ и фибронектин, приводя, в результате, к сильной адгезии тромбоцитов на стенку сосуда и их агрегации между собой.

Важность интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ для гемостаза очень существенна. Мутации в генах, кодирующих интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ (тромбостения Гланцмана), приводят к значительным нарушениям в свертывании крови [55]. Антагонисты, блокирующие связывание интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ с фибриногеном, антитела к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$ или низкомолекулярные соединения, распознающие данный интегрин, являются эффективными антитромботическими препаратами [56, 57]. Активация

интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ запускается воздействием тромбина, АДФ, эпинефрина, сигнализацией через активацию ффВ или коллагеном через активацию ГПVI и интегрина $\alpha_2\beta_1$.

Проведение сигнала интегринами характеризуется тем, что они способны регулировать воздействие внеклеточного матрикса на внутриклеточные процессы, модифицируя поведение клетки. Это влияние является взаимным, поскольку внутриклеточные биохимические реакции, в которых интегрины работают как субстраты, в результате приводят к изменению конформации интегринов и, в конечном итоге, за счет этого к изменению взаимодействия клетки с матриксом. Таким образом, два пути внутриклеточной сигнализации на данный момент определены как характерные для интегринов: outside-in и inside-out [54]. Общий принцип регуляции функции интегринов изнутри клетки был назван «inside-out» сигнализацией, в отличие от сигнализации «outside-in», которая идет снаружи клетки внутрь нее. Обе эти сигнализации, очевидно, затрагивают еще и трансмембранное проведение сигналов, природа которого на сегодняшний день плохо изучена.

Интегрины, экспрессированные на поверхности тромбоцитов, являются основным классом рецепторов к внеклеточному матриксу, которые ответственны за клеточную адгезию. Интегрины структурно и функционально связаны с актиновым цитоскелетом [58, 59], также как и с другими цитоскелетными белками, такими как талин и винкулин [60, 61, 62]. Исследование, в котором ген винкулина был удален, показало, что отсутствие винкулина не нарушает физиологический ответ, зависящий от интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ и F-актина, предполагая, что другие белки могут замещать или компенсировать винкулин в его отсутствие [63].

Активация интегринов достигается серией inside-out сигнальных событий, что приводит, в результате, к связыванию двух ключевых активаторов интегринов с их цитоплазматическим доменом: талина и киндлина. Агонист-индуцируемая активация тромбоцитарного интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ зависит OT взаимодействия талин-интегрин, которое необходимо для ретракции фибринового сгустка [64]. Киндлин является одним из недавно идентифицированных активаторов интегрина: киндлин-3 тромбоцитах является основной В функциональной изоформой, требуемой для интегрин-регулируемых ответов, которые осуществляются за счет связывания киндлина-3 с цитоплазматическим хвостом β-цепи, что необходимо для модуляции аффинности интегрина [65, 66]. Показано, что отсутствие киндлина-3 приводит к кровотечениям и нарушениям в иммунитете у человека [67, 68].

1.2.3 Р-селектин

Р-селектин является ключевой молекулой, которая регулирует адгезию лейкоцитов из движущегося потока крови к сосудистой стенке [69]. Изначально Р-селектин был обнаружен как один из компонентов α-гранул тромбоцитов и как экспрессирующийся эндотелиальными клетками белок. Позднее было показано, что Р-селектин регулирует связывание нейтрофилов с тромбоцитами и эндотелиальными клетками [70, 71, 72]. Р-селектин человека имеет строение, характерное для всех селектинов: N-концевой лектиновый домен, затем следует единственный ЭФР(эпидермальный фактор роста)-подобный повтор, 9 так называемых комплимент-связывающих повторов, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост [69]. Внеклеточный домен обеспечивает взаимодействие Р-селектина с его лигандами, в то время как о роли цитоплазматического домена, на данный момент, ничего не известно, так же как и о его возможном взаимодействии с цитоскелетом тромбоцита.

1.2.4 Фокальные контакты

Адгезионный контакт обеспечивает механическое взаимодействие между молекулами внеклеточного матрикса и цитоскелетом клетки и содержит винкулин, α-актинин, талин и многие другие белки. В образовании контакта в качестве связующих звеньев участвуют интегрины, объединяющие внеклеточные

и внутриклеточные структуры. Адгезия к внеклеточному матриксу регулируется сайтами, расположенными вдоль плазматической мембраны, которые скрепляют актиновый цитоскелет с матриксом за счет взаимодействия большого количества белков, совокупность которых называют интегриновой адгесомой [73].

В клетках, не взаимодействующих с внеклеточным субстратом, интегрины диффузно распределены в плазматической мембране и не проявляют своей сигнальной активности. Взаимодействие клетки с белками матрикса приводит к морфологическим изменениям плазматической мембраны, фибриллярных цитоплазматических компонентов клетки, а также цитоскелетных структур. Все перестройки приводят, В результате, К формированию фокальных ЭТИ адгезионных контактов. Фокальные адгезионные контакты содержат белки матрикса с внеклеточной стороны и микрофиламенты, взаимодействующие с актин-связывающими белками, с цитоплазматической стороны. Взаимодействие интегринов с лигандами приводит к образованию как бы «перемычки» между матриксом и актиновым цитоскелетом, причем интегрины концентрируются в кластеры, которые и формируют фокальные адгезионные контакты [74, 75, 76]. Только при этих условиях интегрины сопособны проявлять свою сигнальную активность.

Фокальные контакты играют важную роль в адгезии: они являются якорем, обеспечивающим фиксацию пучков актиновых микрофиламентов, вовлеченных в морфогенетические реакции клетки (распластывание на субстрате, образование филоподий и ламеллиподий, эндоцитоз и др.) и клеточное передвижение [77, 78, 79].

Сама по себе адгезия является интегрин-зависимым процессом. Например, прикрепление фибробластов на фибронектин вызывает формирование адгезионных фокальных контактов, в то время как этот же эффект не наблюдается при прикреплении на конканавалин, с которым интегрин не взаимодействует [80].

Фокальная адгезия также может быть образована BO время прикрепления клеток не только на матриксных белках, но также на других субстратах, которые могут связывать интегрины, например, на иммобилизованных анти-интегриновых антителах. Такой подход часто используется для специфической активации индивидуальных рецепторов [81, 82].

Состав фокальных адгезионных контактов и активность их макромолекулярных составляющих сильно зависит от физиологических условий, и они способны варьировать даже в пределах одной клетки [78, 83, 84]. Рис. 2 показывает сильно упрощенный и только один возможный вариант (из множества возможных вариантов) состава и взаимодействий макромолекул в адгезионном фокальном контакте, поскольку многие из молекул, идентифицированные как участники фокальной адгезии, на нем не показаны.

1.3 Вклад интегринов в фокальную адгезию

Ранняя стадия формирования фокальной адгезии представляет собой формирование сначала фокального комплекса, он содержит в своем составе маленькие кластеры интегринов, которые образуют относительно слабые связи с субстратом. Затем, на более поздней стадии образующегося фокального контакта, происходит формирование актимиозинового волокна, известного также как стресс-филаменты. После этого идет процесс привлечения добавочных кластеров интегринов в эти фокальные комплексы. Этот процесс сопровождается конформационными изменениями в структуре интегринового димера, которые увеличивают его аффинность для матриксного субстрата, что приводит к образованию плотного фокального адгезионного контакта [78, 85]. В этих реакция малые цитоплазматические G-белки известные как GTP-азы Rho-семейства играют основную роль.

Цитоплазматические домены α- и β-субъединиц интегрина являются ключевыми участниками процесса проведения сигнала при адгезии. Фактически несколько десятков цитоплазматических белков взаимодействуют с

23

интегринов. Они включают в себя внутриклеточными доменами белки, фосфокиназы, цитоскелетные белки, адапторные шапероны, транскрипционные кофакторы и другие белки с неизвестной функцией [74, 77]. В цитоплазматические белки большинстве случаев взаимодействуют с βсубъединицей интегрина. Поэтому именно β-субъединица рассматривается как цитоскелета, ключевой участник организации фокальной адгезии И внутриклеточной сигнализации, протекающей через интегрины. Например, β2 мутантные рецепторы ß1. И β3-субъединиц с отсутствующим цитоплазматическим доменом в β-субъединице были неспособны образовывать кластеры, помимо этого, эти рецепторы проявляли сниженную активность в связывании лиганда и сигнальной активности [77, 86, 87].



Рис. 2. Схематиченая структура фокальной адгезии – один из возможных вариантов [90]. На рисунке обозначены: компоненты внеклеточного матрикса (matrix); молекулы интегринов (integrins); плазматическая мембрана (plasmatic membrane, PM) актин (actin); миозин (myosin); α -актинин (α -actinin, α -act); киназа фокальной адгезии (focal adhesion kinase, FAK); нерецепторная тирозинкиназа Src; талин (talin); тензин (tensin, ten) паксиллин (paxillin, Pax); винкулин (vinculin, Vinc); белок-адаптер (CAS); филамин (filamin, filam).

В порядке изучения роли βцитоплазматического домена субъединицы интегрина был исследован цитоплазматический домен с делецией 15 С-концевых аминокислот β1-субъединицы, который показал, что такая химера неспособна нормально связывать цитоскелетные белки, поскольку солокализация была актина, филамина И талина сильно снижена по сравнению С немодифицированной β-субъединицей [88].

Несмотря на то, что основная масса экспериментальных данных указывает на основной вклад именно β -субъединицы интегринов в организацию фокальной адгезии, существуют и некоторые свидетельства о том, что α -субъединица также вовлечена в этот процесс. Например, делеция цитоплазматического домена α 1субъединицы в коллаген-связывающем интегрине $\alpha_1\beta_2$ приводит к потере способности формировать фокальную адгезию при выращивании клеток на коллагене, в то время как их внесение в среду, содержащую поверхность с иммобилизованным фибронектином, приводит к формированию фокальной адгезии и распластыванию клеток. Было также продемонстрировано, что α 1субъединица, содержащая интактный цитоплазматический домен, связывает талин, α -актинин и паксиллин, в то время как α 1-субъединица, у которой отсутствует данный домен неспособна связывать эти белки [89].

На данный момент нет единой гипотезы о том, как связаны активация интегринов и их заякоривание с цитоскелетом, предполагают, что когда интегрин не связан с лигандом, то цитоплазматический домен α-субъединицы каким-то взаимодействию образом препятствует цитоплазматического домена Bсубъединицы с цитоскелетом. Связывание лиганда приводит к конформационным изменениям в структуре димера интегрина, что, в результате, позволяет ему взаимодействовать с белками. Таким иитоскелетными образом, цитоплазматический домен α-субъединицы специфическую отвечает за активацию интегрина (которая зависит от белков матрикса), образование фокальной адгезии и внутриклеточную сигнализацию [90]. Однако, существует и

25

другая возможная схема взаимодействия интегринов с цитоскелетом, которая предполагает, что при связывании матриксных белков уже существующие кластеризация интегринов и их взаимодействие с цитоскелетом только усиливается (Рис. 3). Подобная гипотеза о уже существующей ассоциации интегринов с цитоскелетными белками в неактивированных тромбоцитах поддерживается наблюдением о том, что и в неактивированных тромбоцитах интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ высаживается вместе с фракцией цитоскелетных белков, что предполагает, что активация тромбоцитов только способствует заякориванию интегрина и перестройке его взаимодействий с цитоскелетом [91].



Рис. 3. Связывание интегринов с матриксом способствует их кластеризации и ассоциации с цитоскелетом [92]. Это, в свою очередь, способствует дальнейшей кластеризации интегринов и организации матрикса в системе положительной обратной связи. На рисунке обозначены: компоненты внеклеточного матрикса (matrix); молекулы интегринов (integrin); актиновый цитоскелет (actin cytoskeleton); Arg-Gly-Asp интегрин-связывающий аминокислотный мотив (RGD); киназа фокальной адгезии (focal adhesion kinase, FAK); нерецепторная тирозинкиназа Src; талин (talin, Tal); паксиллин (paxillin, Pax); винкулин (vinculin, Vin); белок-адаптер p130CAS (CAS).

Сигнализация через интегрины протекает по одному из общих для всех сигнальных систем механизму: через каскады фосфорилирования в клетке, которые катализируются внутриклеточными фосфокиназами. Было показано, что кластеризация интегринов не только приводит к сборке фокальной адгезии, включающей цитоскелетные белки, но также концентрирует некоторые фосфокиназы в сформировавшихся структурах. Эти фосфокиназы запускают последовательное фосфорилирование внутриклеточных белков, проявляющих специфические функции в клетке. Некоторые белки, которые подвергаются фосфорилированию в результате запуска этого сигнального каскада, являются напрямую включенными в фокальную адгезию белками, например тензин и паксиллин [93, 94]. Интегрины запускают фосфорилирование также протеинкиназ, локализованных в фокальной адгезии (FAK, Src, Abl и др.) и необходимых для их активации [95, 96, 97].

Таким образом, можно говорить о том, что адгезия самым прямым образом связана с цитоскелетом тромбоцитов и без этой связи адгезионных белков с цитоскелетом было бы в принципе невозможно прикрепление тромбоцитов к стенке сосуда в условиях потока, поскольку механическая прочность такого контакта была бы крайне невелика.

1.4 Цитоскелет тромбоцитов и его роль в адгезии и агрегации тромбоцитов

Цитоскелет неактивированных тромбоцитов сформирован из нитевидного актина (F-актина), маргинального кольца микротрубочек, промежуточных филаментов и связывающих белков. Во время активации тромбоцита и процесса адгезии происходит перестройка цитоскелета тромбоцитов (Рис. 4): актиновые филаменты образуют филоподии, ламеллиподии, фокальные адгезии, стрессфиламенты и сократительное кольцо. Фрагменты кольца микротрубочек



Рис. 4. Схематичная организация цитоскелета тромбоцитов [98]. Цитоскелет неактивированных тромбоцитов состоит из актиновой коры, образованной короткими и тщательно упакованными актиновыми филаментами, и кольца микротрубочек, расположенного в центре тромбоцита. При активации тромбоцита динеины скользят по актину, вызывая закручивание кольца из микротрубочек. В то же время глобальная перестройка актина вызывает выпячивание филоподий, гда актин образует длинные, параллельные филаменты. Финальным событием, завершающим перестройку цитоскелета, является контракция тромбоцита, которая регулируется актин-миозиновой мишинерией, использующей спираль из микротрубочек в качестве структурной поддержки. На рисунке обозначены: неактивированный тромбоцит (resting platelet); активированный тромбоцит (activated platelet); образование сгустка и ретракция (clot formation and contraction); актиновая кора (actin cortex); кольцо микротрубочек (microtubule (MT) band); свертывание микротрубочек (microtubule (MT) coiling); филоподии (filopodia); актин-миозиновая контракция (actinomyosin contraction).

расходятся, в то время как промежуточные филаменты связываются с плазматической мембраной и грануломером [99].

При адгезии и агрегации тромбоцитов также происходит перестройка их цитоскелета. частности цитоплазматических актиновых филаментов В И мембранного который располагается непосредственно скелета. под цитоплазматической мембраной и состоит как из актиновых филаментов, так и из микротрубочек [100]. К мембранному скелету тромбоцитов прикреплен ряд мембранных гликопротеинов тромбоцита (Рис. 5).

Актин является основным компонентом цитосклета неактивированных тромбоцитов (Рис. 6). Актин является высококонсервативным глобулярным белком с молекулярным весом 42 кДа. В живых клетках актин полимеризуется, образуя F-актин, который имеет средний диаметр порядка 8 нм и состоит из двух спиральных протофиламентов, состоящих из субъединиц глобулярного актина (G-

актин), которые закручиваются одна вокруг другой и состоят из 14 мономеров [101]. При активации тромбоцита происходит кардинальная перестройка его цитоскелета: количество общего актина в филаментах быстро увеличивается с 30 до 70% [102].



Рис. 5. Схематичное представление организации актиновых филаментов в неактивированных тромбоцитах [103]. На рисунке обозначены: мембранный скелет (membrane skeleton); цитоплазматические актиновые филаменты (cytoplasmic actin filaments); мембранный гликопротеины (membrane glycoproteins).

Полимеризация актина приводит к расширению динамических клеточных структур, таких как филоподии и ламеллиподии, тем самым, приводя к движению клетки [104]. В то время как более стабильные актиновые сети образуют статические клеточные структуры, такие как стресс-волокна, которые и функционируют в клеточной адгезии [105].

Активация тромбоцитов в суспензии или распластывание их на поверхности приводит к последовательности морфологических изменений, таких как округление, выпячивание филоподий, прикрепление, распластывание и сокращение [106, 107]. После того как тромбоцит прикрепляется к поверхности, его дискоидная форма изменяется, становясь сферической, и он становится немного меньше в результате своего сокращения. Выпячивание филоподий становится следующим событием вслед за округлением тромбоцита [108].

Филоподии являются высокодинамичными актинобогащенными выпячиваниями клеточной поверхности, которые распространяются главным образом от периферии клетки и помогают клеткам чувствовать их внешнее окружение. Сdc42 является хорошо известным фактором, который запускает образование филоподий [109]. Недавно также было показано, что Cdc42 также участвует и в агрегации тромбоцитов, определяя секрецию гранул и демонстрируя, таким образом, что Cdc42 принципиально важен для нормальной функции тромбоцитов [110].



Рис. 6. Приведена реплика цитоскелета интактного неактивированного тромбоцита [111], бар 0,5 мкм. Структура интактного цитоскелета тромбоцитов, полученного с помощью фиксации клеток 1% глутаровым альдегидом с одновременной пермеабилизацией с использованием неионного детергента Тритона X-100. Тромбоциты были прикреплены к стеклянной поверхности с иммобилизиованным на ней полилизином.

Филоподии активированных тромбоцитов содержат плюс-конец сборки актина, в то время как структура актина в ламеллах показывает, что он формирует

плотную ортогонально- разветвленную сеть. Однако, предотвращение обычного повышения цитозольного кальция, сопровождающее активацию тромбоцитов, ингибирует образование ламеллиподий, но не филоподий, показывая таким образом, что эти актиновые структуры являются функционально и морфологически различны [112].

Ламеллиподии представляют из себя широкую и плоскую сеть актиновых филаментов со многими микронами в длину и ширину и только 0,1-0,2 мкм в высоту [113]. Внутри ламеллиподия актиновый цитоскелет образует дендридный массив [114, 115], в котором зарождаются нити филаментов из Arp2/3 комплексов, который является основным регулятором динамики актина в тромбоцитах и отвечает за образование филоподий и ламеллиподий [116]. ADF/кофилин действие, связанное с гидролизом ATФ, способствует разборке актиновых филаментов. Актиновые филаменты ориентируются с их плюс-концов по направлению к передней кромке, и такое расположение является критичным для сохранения ламеллопоидальной структуры. Эксперименты *in vivo* показали, что оборот актиновых филаментов критическую роль в конечной фазе образования тромбоцитов, также как в созревании и калибровке по размеру ранних тромбоцитов для продуцирования гомогенной зрелой субпопуляции тромбоцитов [117].

Адгезия тромбоцитов к стеклянной поверхности запускает изменение формы, которое включает организацию актиновых филаментов в виде 4-х образующихся различных структур: филоподия, ламеллиподия, сократительное кольцо и стресс-волокна, причем каждая из этих структур содержит различный комплект актин-связывающих белков [118].

Актиновые узелки представляют собой недавно открытую актиновую структуру, состоящую из точечных областей актина, причем впервые данное явление наблюдали в самом начале формирования ламеллиподии внутри тромбоцитов распластанных на смесь матриксных белков. Предполагают, что актиновые узелки образуются на ранних стадиях полимеризации актина и что они играют важную роль в стимулировании образования более поздних актиновых структур, включая ламеллиподии, и что, возможно, они вносят вклад в формирование стресс-фибрилл [119].

Тромбоциты способны регулировать свое распластывание и морфологию в зависимости от окружающей геометрии, влияющей на реорганизацию цитоскелета тромбоцитов в ответ на геометрические ограничения со стороны микроокружения [120], причем аналогичное явление было обнаружено также и в ядерных клетках млекопитающих [121]. Это показывает, что молекулярная машинерия, необходимая для адгезии тромбоцитов и их распластывания, является весьма похожей на ту, которая присутствует и в других подвижных клетках [122].

Наконец, также не последнюю роль играет цитоскелет для регулирования явления контракции (сжатия) сгустка. Для контракции сгустка необходимо сокращение тромбоцитов, которое достигает стабильного состояния после 25 мин, оказывая общее усилие примерно в 34 нН [123]. Для выполнения таких сокращений сгустка, происходит структурная перестройка цитоскелета, которая привлекает цитоплазматические и мембранные белки, способствует полимеризации актина и организации филаментов в структуры более высокого порядка, такие как стресс-волокна.

Стресс-волокна состоят из пучков актиновых филаментов и миозина II и позволяют немускульным клеткам применять сократительные усилия. Ранние работы идентифицировали α-актинин и миозин как динамически перераспределенные и ассоциированные с реорганизованными актиновыми «ка́белями» в теле клетки в распластанных тромбоцитах во время процесса адгезии [124], в которой RhoA является критичным регулятором формирования актиновых стресс-волокон [125]. Существует также другой ключевой элемент работающий кооперативно: ось PI-3 киназа/RhoA/mDia1, которая является критичным путем для связывания тромбиновой сигнализации с перестройкой

актинового цитоскелета происходящей во время распластывания тромбоцита [126].

Дискообразная форма тромбоцитов определяется маргинальным кольцом, расположенным непосредственно под плазматической мембраной, которое микротрубочек [127, 128. 129]. состоит практически полностью ИЗ Микротрубочки являются полимерами димеров α-тубулина и β-тубулина, которые образуют линейные массивы называемые протофиламентами, латерально ассоциирующие С образованием полой жесткой трубчатой структуры, характерной для микротрубочек. Основная масса образующего микротрубочку βтубулина представляет собой β 1-тубулин (дивергентная форма β -тубулина, которая представлена исключительно в мегакариоцитах и тромбоцитах) [130, 131].

Недавно динамика микротрубочек была визуализирована в живых клетках, в результате было показано, что маргинальное кольцо микротрубочек, состоит из биополярных динамических микротрубочек, множества возникающих ИЗ единственной стабильной микротрубочки. Динамичность микротрубочек обеспечивает тромбоцитам способность изменять свой цитоскелет во время физиологических процессов, таких как уменьшение их размера во время старения и образование радиального массива микротрубочек, что достигается за счет образования филоподий во время активации и адгезии [99].

Несмотря на то, что проведены многочисленные исследования цитоскелета тромбоцитов и его перестройки в процессе их активации, до сих пор накоплено крайне мало информации о механической функции тромбоцитов и ее координации с внутриклеточным структурным ремоделированием их цитоскелета [98]. Помимо этого, в понимании процесса адгезии также крайне важно знание множественных молекулярных взаимодействий цитоплазматических доменов адгезионных гликопротеинов с цитоскелетными белками, которые и обеспечивают прочность формируемого механического контакта совместно со взаимодействием внеклеточных доменов с матриксными белками.

1.5 Прикрепление мембранных адгезионных белков к цитоскелету тромбоцитов и их связь с адгезией тромбоцитов

Адгезия является центральным механизмом, за счет которого клетки механически взаимодействуют с внеклеточным матриксом. Передполагают, что адгезия функционирует как «молекулярное сцепление» между актиновым цитоскелетом и внеклеточными лигандами, обеспечивая посредничество в передаче сил, генерируемых при динамике цитоскелета к внеклеточному окружению [132]. Возможная модель взаимодействия мембранных гликопротеинов и цитоскелетных белков мембранного скелета тромбоцитов показана на Рис. 7.

При адгезии клеток существует определенная последовательность транспорта цитоскелетных белков и сигнальных молекул в область, близкую к плазматической мембране. Кластеризация интегринов вызывает привлечение структурных цитоскелетных белков, таких как винкулин и талин, которые взаимодействуют способствую С актином И его полимеризации В микрофиламенты. На более поздней стадии формирования адгезионного контакта в его состав включается α-актинин. α-Актинин стабилизирует основные филаменты посредством образования кросс-связей со смежными пучками филаментов и способствует их фиксации в околомембранной области благодаря взаимодействию с цитоплазматическим доменом β-субъединицы интегрина. Другие белки. которые интегрины шитоскелетные связывают с микрофиламентами, играют похожую роль. Например, талин образует мостик между цитоплазматическим доменом β-субъединицы интегрина и актином через винкулин, или винкулин-тензин, и, также, через паксиллин-винкулин [74, 78]. Филамин также способен связывать интегрины с микрофиламентами [133].

Среди всех цитоскелетных белков роль талина в функционировании интегринов исследована наиболее детально. Сверхэкспрессия в СНО клетках фрагмента талина, который содержит сайт связывания цитоплазматического домена β-цепи интегрина, приводит к увеличенному связыванию лигандов интегрином α_{IIb}β₃ [134]. Одновременно, уменьшенная экспрессия талина ингибирует экспорт интегринов из аппарата Гольджи, их экспрессию в мембране и образование фокальной адгезии [135, 136].



Рис. 7. Схематичное представление модели мембранного скелета тромбоцитов [137]. Данная модель мембранного скелета тромбоцитов показывает некоторые из белков, которые восстанавливаются вместе с мембранным скелетом из лизированных детерегентом тромбоцитов. Взаимодействия, показанные в этой модели, основываются либо на хорошо известных взаимодействиях, которые встречаются *in vitro* (например, паксиллин взаимодействуент с винкулином), либо показываются просто схематически для демонстрации присутствия этих молекул. На рисунке обозначены: молекулы интегринов $\alpha_2\beta_1$ и $\alpha_{IIb}\beta_3$; актин (actin); комплекс гликопротеин Ib-V-IX (GPIb-IX); спектрин (spectrin); талин (talin); дистрофин-связанный белок (dystrophin-related protein, DRP) ГТФазаактивирующий белок (GTPase-activating protein, GAP); тирозиновая фосфатаза SHPTP1; нерецепторные тирозинкиназы src, yes, syk; сигнальная молекула 14-3-3; паксиллин (paxillin); винкулин (vinculin); филамин (actin binding protein, ABP).

Мутации в талин- связывающем домене βсубъединицы цитоплазматического домена интегрина вызывают ухудшение в транслокации талина и актина в фокальную адгезию без каких-либо изменений в кластеризации интегрина [77].

Другими хорошо охарактеризованными цитоскелетными белками, которые образуют комплекс с β -субъединицей цитоплазматического домена интегрина, являются α -актинин и филамин. Хотя данные белки образуют менее крепкие комплексы с β -субъединицей цитоплазматического домена интегрина чем талин, однако установлено, что для фокальной адгезии, в конечном итоге, также необходимо вовлечение этих белков в ассоциацию с данным доменом интегрина [138]. Мутации в цитоплазматическом домене β -субъединицы, располагающиеся в местах, ответственных за связывание α -актинина, приводят к снижению формирования фокальной адгезии и стресс-фибрилл. Мутационный анализ мест связывания талина и α -актинина показал, что эти белки имеют различные функции внутри клетки, но все эти функции зависят от цитоплазматического домена β -субъединицы [77, 139].

Подобно α-актинину филамин локализуется не только в местах фокальной адгезии, но также вдоль актиновых филаментов. Его функции связаны с механическим стрессом, наблюдающимся в клетках во время изменения их формы, образования филоподий и движения. Мутации в филамин-связывающем сайте, локализованном в С-концевой области цитоплазматического домена β-субъединицы, приводят к снижению сборки интегринов в фокальную адгезию [140].

Таким образом, молекулярная организация мембранного скелета тромбоцитов и фокального комплекса, формируемого при адгезии, крайне сложна и требует участия порядка 100 различных молекул, взаимодействия между которыми также множественны. Помимо этого, общая картина адгезии тромбоцитов усложняется также тем, что при сильной агонист-индуцируемой
физиологической активации тромбоциты способны разделяться на две субпопуляции с кардинально различными свойствами.

1.6 Субпопуляции активированных тромбоцитов

При воздействии высоких концентраций агонистов активированные тромбоциты разделяются на 2 субпопуляции с принципиально различными свойствами [141]: одна из этих субпопуляций имеет на своей внешней мембране высокое содержание ФС, в результате произошедшего при активации процесса симметризации плазматической мембраны (ФС-положительная субпопуляция), в то время как на мембране другой субпопуляции не происходит подобного ΦС заметного экспонирования (ФС-отрицательная субпопуляция). ΦCотрицательная субпопуляция характеризуется наличием филоподий [142], хорошей способностью к агрегации [143] и низким уровнем внутриклеточного кальция [144], в то время как ФС-положительная субпопуляция характеризуется шарообразной формой без филоподий [145], высоким внутриклеточным кальцием [144], низкой агрегаторной способностью [143], но, при этом, обладает значительно большей прокоагулянтной активностью [145]. Прокоагулянтная активность ФС-положительной субпопуляции обуславливается наличием на ее мембране большого количества ФС, что позволяет мембранам таких тромбоцитов эффективно связывать факторы свертывания IXa, VIII, X [146] и приводит к значительному ускорению реакций плазменного свертывания на несколько порядков [147].

Физиологическая роль разделения активированных тромбоцитов на ФСположительную и ФС-отрицательную субпопуляции на данный момент неясна, также противоречивые данные накоплены о распределении данных субпопуляций в тромбе [148, 149, 150].

В ранних работах показано, что при определенных условиях активации тромбоцитов наблюдается протеолитическая деградация ряда цитоскелетных белков, в том числе участвующих в прикреплении мембранных белков к

цитоскелету, таких как филамин и [151]. Предполагают, талин ЧТО наблюдаемая деградация контролируется кальций-активируемой протеазой кальпаином [152]. Кальпаин представлен в тромбоцитах в двух формах, которые различаются по концентрации ионов кальция, которая необходима для их форма (и-кальпаин) является активной в активации: первая диапазоне концентраций йонов кальция 5-50 мкМ, в то время как вторая форма (m-кальпаин) активна в диапазоне концентраций ионов кальция в пределах 200-1000 мкМ [153]. Поскольку тромбоциты при активации агонистами в высокой концентрации образуют ФС-положительную и ФС-отрицательную субпопуляции, в которых концентрация ионов кальция различна [144], то это может приводить к активации разных форм кальпаина В различных субпопуляциях активированных тромбоцитов. Показано. что высвобождающийся при протеолитическом расщеплении талина кальпаином его фрагмент связывается с более высокой аффинностью с β-цепью интегрина, чем сам полноразмерный талин [154]. Физологическое более эффективного значение такого связывания протеолитического фрагмента талина на данный момент неясно, однако предполагают, что, возможно, такой эффект необходим для кластеризации и активации интегринов [154] либо для реорганизации цитоскелета, протекающей при активации тромбоцитов [155].

Протеолитическая деградация ряда цитоскелетных белков, задействованных в прикреплении мембранных гликопротеинов к цитоскелету, возможно влияет на адгезивные свойства тромбоцитов, поскольку именно прикрепление к цитоскелету мембранных гликопротеинов обеспечивает эффективное образование фокальных контактов, прикрепление клеток к внеклеточному субстрату и их адгезию.

<u>Целью данной работы</u> являлось исследование прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов и влияния разрушения прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов к цитоскелету на адгезионные свойства тромбоцитов.

Задачи

- 1. Разработать методику, позволяющую анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях клеток.
- 2. Исследовать прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в неактивированных и субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- 3. Исследовать влияние деградации цитоскелетных белков на прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- Исследовать механизмы, контролирующие прикрепление адгезионных мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- 5. Исследовать влияние деградации цитоскелетных белков, обеспечивающих прикрепление адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету, на адгезионные свойства тромбоцитов.

Глава II. Результаты

2.1 Исследование прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов

Для исследования прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов цитоскелету тромбоцитов был разработан подход, который позволяет к анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету в субпопуляциях клеток, разделяемых с помощью проточной цитометрии на основании разницы в связывании ими флуоресцентных маркеров, характерных ДЛЯ каждой субпопуляции. Данный тромбоцитов подход основан на окрашивании флуоресцентно-меченными антителами к поверхностным мембранным белкам, фиксации окрашенных клеток и последующей обработки их раствором детергента высвобождения мембран фиксированных мембранных лля клеток ИЗ гликопротеинов, которые не связаны с цитоскелетом. Сравнение флуоресценции антител к мембранным гликопротеинам в фиксированных клетках до и после их обработки раствором неионного детергента позволяет судить о том, прикреплены мембранные гликопротеины, детектируемые с помощью ЛИ антител, К цитоскелету клетки или нет: в том случае, если после обработки детергентом фиксированных клеток их флуоресценция не изменяется, это свидетельствует о том, что мембранный гликопротеин прикреплен к цитоскелету, в том же случае, если после обработки детергентом фиксированных клеток их флуоресценция сильно падает, это свидетельствует о вымывании данного мембранного белка и о том, что он не прикреплен к цитоскелету клетки. Аналогичный подход с фиксацией клеток и последующей обработкой их детергентом применяется при анализе ультраструктуры клеток с помощью электронной микроскопии [156], кроме того, ранее было показано, что многие мембранные белки, детектируемые флуоресцентно-меченными антителами с помощью проточной цитометрии,



Рис. 8. Анализ прикрепления интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов (n=4). Неактивированные тромбоциты окрашивали CD61-ФЭ (10 мин), затем тромбоциты фиксировали, обрабатывали раствором неионного детергента Тритона X-100 и анализировали с использованием проточной цитометрии. Тромбоциты активировали добавлением тромбина (100 нМ) и CRP (10 мкг/мл) 20 мин, затем активированные тромбоциты окрашивали одновременно двумя флуоресцентно-меченными антителами PAC1-ФИТЦ и CD61-ФЭ (10 мин), после этого тромбоциты фиксировали, обрабатывали раствором Тритона X-100 и анализировали с использованием проточной цитометрии. Представлены результаты типичного эксперимента (n=4). А. Приведены типичные дот-плоты фиксированных неактивированных и активированных тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. В. Приведены типичные гистограммы флуоресценции неактивированных и активированных PAC+(PAC1-положительных) и PAC-(PAC1-отрицательных) тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. Черные гистограммы соответствуют флуоресценции фиксированных тромбоцитов без обработки их детергентом, серые гистограммы показывают флуоресценцию фиксированных тромбоцитов после обработки их детергентом.

вымываются из фиксированных клеток в результате их последующей обработки детергентом [157].

С помощью данного подхода было проанализировано прикрепление ключевых адгезионных белков тромбоцита (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, ГПІb) и Р-селектин) к цитоскелету клетки. Было исследовано прикрепление адгезионных белков к цитоскелету клетки в неактивированных тромбоцитах и 2-х субпопуляциях активированных тромбоцитов (Рис. 8-10). Анализ дот-плотов флуоресценции неактивированных тромбоцитов, которые были окрашены флуоресцентномеченными антителами к интегрину α_{шь}β₃, затем зафиксированы и обработаны раствором неионного детергента, показывает, что никакого различия BO флуоресценции предварительно окрашенных фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом не выявлено (Рис. 8), что предполагает, что интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ прикреплен к цитоскелету в неактивированных тромбоцитах. В то же время при анализе дот-плотов флуоресценции ФС-положительных и ФСтромбоцитов (ФС-положительные отрицательных активированных _ ЭТО отрицательные по РАС1, и ФС-отрицательные – это положительные по РАС1) видно, что в случае ФС-положительных тромбоцитов происходит значительный сдвиг флуоресценции антител к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$ в область более низких значений результате постобработки предварительно окрашенных фиксированных В тромбоцитов раствором детергента (Рис. 8), в то же время для ФС-отрицательных активированных тромбоцитов такого сдвига флуоресценции не наблюдается (Рис. 8). Дополнительный анализ гистограмм флуоресценции для неактивированных и субпопуляций активированных тромбоцитов показывает, что только в случае ФСактивированных тромбоцитов наблюдается положительных значительное гистограммах флуоресценции предварительно различие В окрашенных антителами фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом (Рис. 8).



Рис. 9. Анализ прикрепления гликопротеина Іb к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов. Неактивированные тромбоциты окрашивали CD42b-ФЭ (10 мин), затем тромбоциты фиксировали, обрабатывали раствором неионного детергента Тритона X-100 и анализировали с использованием проточной цитометрии. Тромбоциты активировали добавлением тромбина (100 нМ) и CRP (10 мкг/мл) 20 мин, затем активированные тромбоциты окрашивали одновременно двумя флуоресцентно-меченными антителами РАС1-ФИТЦ и CD42b-ФЭ (10 мин), после этого тромбоциты фиксировали, обрабатывали раствором неионного детергента Тритона X-100 и анализировали с использованием проточной цитометрии. Представлены результаты типичного эксперимента (n=4). А. Приведены типичные дот-плоты фиксированных неактивированных и активированных тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. В. Приведены типичные гистограммы флуоресценции неактивированных и активированных РАС+(РАС1-положительных) и РАС-(РАС1-отрицательных) тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. В. Приведены типичные гистограммы флуоресценции неактивированных и активированных РАС+(РАС1-положительных) и РАС-(РАС1-отрицательных) тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. Черные гистограммы соответствуют флуоресценции фиксированных тромбоцитов без обработки их детергентом, серые гистограммы показывают флуоресценцию фиксированных тромбоцитов после обработки их детергентом.

Полученные данные, которые показали, что только в ΦC положительных тромбоцитах наблюдается вымывание интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ из зафиксированных клеток после их обработки детергентом, предполагают, что только в случае ΦC -положительных тромбоцитов происходит разрушение связи интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ с цитоскелетом клетки, в то время как в неактивированных и ΦC отрицательной субпопуляции активированных тромбоцитов интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ прикреплен к цитоскелету. Для тромбоцитов, окрашенных флуоресцентномеченными антителами к ГПІВ и Р-селектину, были получены аналогичные интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$ результаты (Рис. 9 и Рис. 10).



Рис. 10. Анализ прикрепления Р-селектина к цитоскелету в субпопуляциях тромбоцитов. Тромбоциты активировали добавлением тромбина (100 нМ) и CRP (10 мкг/мл) 20 мин, затем активированные тромбоциты окрашивали одновременно двумя флуоресцентно-меченными антителами РАС1-ФИТЦ и CD62P-ФЭ 10 мин, после этого тромбоциты фиксировали, обрабатывали раствором неионного детергента Тритона X-100 и анализировали с использованием проточной цитометрии. Представлены результаты типичного эксперимента (n=4). А. Приведены типичные дот-плоты фиксированных активированных тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. В. Приведены типичные гистограммы флуоресценции активированных РАС+(PAC1-положительных) и РАС-(PAC1-отрицательных) тромбоцитов перед и после их обработки детергентом. Черные гистограммы соответствуют флуоресценции фиксированных тромбоцитов без обработки их детергентом, серые гистограммы показывают флуоресценцию фиксированных тромбоцитов после обработки их детергентом.

2.2 Исследование белкового профиля тромбоцитов при их активации

На основании полученных данных о том, что только в ФС-положительных активированных тромбоцитах наблюдается значительное падение флуоресценции после обработки детергентом предварительно окрашенных антителами к мембранным адгезионным белкам фиксированных клеток, было высказано предположение о том, что именно в ФС-положительных активированных тромбоцитах происходит практически полное разрушение связи, обеспечивающей прикрепление мембранных адгезионных белков к цитоскелету.

Из ранних исследований известно, что при определенных условиях активации тромбоцитов наблюдается деградация ряда цитоскелетных белков [151], в частности это талин и филамин, которые напрямую вовлечены в прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки. Филамин, талин и продукты их протеолитической деградации можно детектировать с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [151]. Поэтому, предполагая, что разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки, наблюдаемое с помощью проточной цитометрии, может быть связано с деградацией некоторых цитоскелетных белков, обеспечивающих прикрепление данных мембранных гликопротеинов к цитоскелету, был проанализирован белковый дополнительно профиль неактивированного тромбоцита и его изменение при различных условиях активации тромбоцитов с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (Рис. 11).

Были использованы условия активации, которые дают разное соотношение ФС-положительных и ФС-отрицательных активированных тромбоцитов, т.е. варьировали концентрации агонистов при активации, что изменяет соотношение ФС-положительных и ФС-отрицательных активированных тромбоцитов [158]. Как и предполагали, при увеличении концентрации активирующих агонистов



Рис. 11. Формирование субпопуляций тромбоцитов и деградация цитоскелетных белков при сильной физиологической активации тромбоцитов. А,В. Тромбоциты активировали с различными концентрациями агонистов (тромбин (нМ) и СRP (мкг/мл): 200/20, 50/5, 12,5/1,25, 3,1/0,3, 0,78/0,08) в течение 15 мин и анализировали проточной цитометрией (А) и электрофорезом белков (В). Для анализа с помощью проточной цитометрии активированные тромбоциты окрашивали одновременно РАС1-ФИТЦ и аннексин V-Алекса Флуор 647 (5 мин), разбавляли с буфером А, содержащим 2,5 мМ хлорид кальция, и немедленно анализировали на проточном цитометре (А). Приведен типичный результат для формирования субпопуляций активированных тромбоцитов при различной активации (A, n=3). Для анализа электрофорезом активированные тромбоциты (50 млн) были осаждены центрифугированием при 1000g (10 мин), затем растворены в ДСН-содержащем буфере, прокипячены и нанесены на 7.5% ДСН-полиакриламидный гель. Профиль белков активированных тромбоцитов приведен (В). Стрелками указаны продукты протеолиза, происходящего в результате активации тромбоцитов. С-Е. Тромбоциты активировали тромбином (100 нМ) и СRР (10 мкг/мл) в течение соответствующих временных интервалов, затем окрашивали одновременно РАС1-ФИТЦ и аннексин V-Алекса Флуор 647 (2 мин), после этого тромбоциты разводили буфером A, содержащем 2,5 мМ хлорид кальция, и сразу же анализировали на проточном цитометре. Приведены типичные дот-плоты активированных тромбоцитов (С, D, n=3). Числа на дот-плотах показывают процент клеток, которые попали в соответствующий регион. Типичная кинетика формирования субпопуляций тромбоцитов при их активации приведена (E, n=3).

наблюдали увеличение количества ФС-положительных активированных тромбоцитов (Рис. 11 А), что детектировали с помощью проточной цитометрии по связыванию флуоресцентно-меченного аннексина V. Одновременный анализ тех же самых клеток электрофорезом в ПААГ показал (Рис. 11 В), что при увеличении концентрации активирующих агонистов (что коррелирует с увеличение процента ФС-положительных тромбоцитов) появляются характерные полосы деградации ряда цитоскелетных белков (Рис. 11 В), таких как филамин, талин и миозин. Помимо идентификации полос филамина, талина и миозина по молекулярному весу в геле, которые уверенно детектируются в белковом профиле неактивированных тромбоцитов (Рис. 11 В), дополнительно была проведена их идентификация с помощью масс-спектрометрии [159], которая подтвердила принадлежность этих полос данным белкам. С увеличением концентраций активирующих агонистов интенсивность окрашивания полос в геле, характерных для филамина, талина и миозина, постепенно падала, что свидетельствует о том, что деградация этих белков коррелирует с увеличением количества ФСтромбоцитов (Рис. 11 A). положительных активированных Полученные результаты свидетельствуют о корреляции деградации талина, филамина и миозина с формирование субпопуляции ФС-положительных тромбоцитов.

Для подтверждения гипотезы о том, что деградация цитоскелетных белков происходит только в ФС-положительных тромбоцитах дополнительно был исследован статус филамина, талина и миозина в ФС-положительной и ФСотрицательной субпопуляциях активированных тромбоцитов, которые были предварительно разделены с помощью сортировки клеток на проточном цитометре с функцией сортировки (Рис. 12). Сортировка клеток позволяет физически разделить субпопуляции исследуемых клеток для их дальнейшего анализа. ФС-положительные и ФС-отрицательные тромбоциты были проанализированы с помощью электрофореза в ПААГ (Рис. 12): на геле хорошо видно отсутствие полос, характерных для филамина, талина и миозина, в белковом профиле субпопуляции ФС-положительных активированных тромбоцитов, в то время как в белковом профиле субпопуляции



Рис. 12. Анализ деградации ряда цитоскелетных белков в субпопуляциях активированных тромбоцитов. Тромбоциты активировали 100 нМ тромбином и 10 мкг/мл СRР, затем с использованием сортера клеток разделяли на ФС-положительную (ФС+) и ФС-отрицательную (ФС-) субпопуляции (субпопуляции разделяли по их связыванию аннексина V). Равное количество ФС+ и ФС- тромбоцитов (0,75×10⁶ клеток) анализировали с использованием электрофореза в ПААГ, белки в геле визуализировали окрашиванием серебром. На рисунке приведены белковые профили ФС+ и ФС- субпопуляции, а также маркеры молекулярного веса (Мг, кДа).

ФС-отрицательных активированных тромбоцитов эти полосы присутствуют (Рис. 12). Полученные результаты также подтверждают гипотезу о том, что деградация цитоскелетных белков, таких как филамин и талин, отвечающих за прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки, наблюдается только в ФС-положительных активированных тромбоцитах.

2.3 Выявление механизма, ответственного за разрушение связи адгезионных мембранных гликопротеинов с цитоскелетом тромбоцита

В ранних работах было показано, что деградация филамина и талина, участвующих в прикреплении адгезионных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцита, опосредована активацией кальций-зависимой протеазы кальпаина [152]. Поскольку, прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки – это очень сложный процесс, который контролируется множеством специальных белков – неясно, насколько кальпаин-опосредованная деградация филамина и талина вовлечена в контроль прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету. Для исследования того, насколько кальцийзависимая активация кальпаина может быть вовлечена В разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету, был использован разработанный ранее метод, основанный на проточной цитометрии, где анализируется флуоресценция антител к мембранным гликопротеинам на фиксированных клетках до и после их обработки детергентом. В том случае, если активация кальпаина вовлечена в контроль прикрепления мембранных белков к цитоскелету, то преинкубация тромбоцитов с ингибиторами кальпаина будет ингибировать разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету, которое наблюдали ранее (Рис. 8-10). Это будет выражаться в уменьшении падения флуоресценции антител к мембранным гликопротеинам после обработки детергентом фиксированных тромбоцитов, которые были преинкубированы с ингибиторами кальпаина, в сравнении с тромбоцитами, которые не были предварительно обработаны ингибиторами кальпаина. Было проанализировано влияние ингибиторов кальпаина на разрушение прикрепления интегрина α_{Шь}β₃ к цитоскелету (Рис. 13). Для этого часть тромбоцитов перед активацией была проинкубирована с различными ингибиторами кальпаина (кальпептин, MDL28170 и PD150606), затем тромбоциты активировали,



Рис. 13. Анализ влияния ингибиторов кальпаина на прикрепление интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов. Тромбоциты преинкубировали 60 мин с 0,2% ДМСО в качестве контроля (A), 200 мкМ кальпептином (B), 200 мкМ MDL28170 (C), или 200 мкМ PD150606 (D), затем их активировали 100 нМ тромбином с 10 мкг/мл CRP, окрашивали одновременно PAC1-FITC и CD61-PE в течение 10 мин, фиксировали, обрабатывали детергентом и анализировали проточной цитометрией. Приведены результаты типичного эксперимента (n = 3): дот-плоты активированных фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом и гистограммы флуоресценции CD61-ФЭ для PAC1-положительных (PAC1+) и PAC1-отрицательных (PAC1-) активированных тромбоцитов перед (черным) и после (серым) их обработки детергентом.

окрашивали флуоресцентно- меченными антителами к интегрину $\alpha_{IIb}\beta_3$, фиксировали и обрабатывали детергентом (Рис. 13). Анализ дот-плотов и гистограмм флуоресценции фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом показывает, что в присутствии ингибиторов кальпаина разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету клетки значительно снижено, по сравнению с тромбоцитами без ингибиторов (Рис. 13).

Однако, сравнение флуоресценции обработанных детергентом фиксированных тромбоцитов проинкубированных с ингибиторами c необработанными детергентом фиксированными тромбоцитами, показывает, что небольшое снижение флуоресценции в результате обработки детергентом происходит (Рис. 13), что может свидетельствовать как о том, что, либо ингибиторы не полностью подавляют активацию кальпаина, либо, что в процесс разрушения связи между мембранными гликопротеинами и цитоскелетом могут быть вовлечены и другие механизмы. Данные результаты, однако, предполагают, все-таки основным механизмом, который контролирует разрушение что мембранных прикрепления гликопротеинов к цитоскелету клетки, наблюдающееся в ФС-положительных активированных тромбоцитах, является именно активация кальций-зависимой протеазы кальпаина.

2.4 Анализ кинетики потери целостности мембраны тромбоцита при экспозиции ФС

Поскольку разработанный метод детекции прикрепления мембранных белков к цитоскелету базируется на связывании флуоресцентно-меченных антител с мембраной клетки, то важно, чтобы при этом не было проникновения антител внутрь клетки, поскольку показано, что активированные ФСположительные тромбоциты имеют повережденную плазматическую мембрану [160]. Поэтому, для этого необходимо выполнить анализ кинетики потери целостности мембраны тромбоцита одновременно с анализом экспозиции ФС для того, чтобы знать в какой момент при экспозиции ФС происходит потеря

51

ΦCмембраны тромбоцита. целостности положительного Кинетику потери целостности мембраны тромбоцита исследовали с помощью анализа удерживания флуоресцентного красителя кальцеина в клетках (хорошо удерживается в живых клетках с неповрежденной мембраной, но не удерживается клетках, мембрана которых повреждена) при формировании В мертвых субпопуляции ФС-положительных тромбоцитов (Рис. 14). Полученные результаты показывают, что



Рис. 14. Анализ кинетики потери целостности мембраны тромбоцита при его активации и экспозиции им ФС. Тромбоциты были нагружены кальцеином и затем активированы добавлением тромбина до 100 нМ в присуисивии 2,5 мМ хлорида кальция. Для детекции ФС-положительной субпопуляции (ФС+ тромбоциты) при активации был добавлен аннексин V-Алекса Флуор 647. В указанное время аликвоты с активированными тромбоцитами были проанализированы с помощью проточной цитометрии. Приведены результаты типичного эксперимента (n=3). А-В. На графике приведена кинетика формирования ФС-положительных тромбоцитов (указан процент от общего числа активированных тромбоцитов) и кинетика вытекания кальцеина из сформировавшейся субпопуляции ФС-положительных тромбоцитов, удерживающих кальцеин, от количества ФС-положительных тромбоцитов).

вытекание кальцеина из клеток, характерное для клеток с поврежденной мембраной, является более поздним процессом, чем появление ФС на мембране тромбоцита, и свидетельствует о том, что потеря целостности мембраны наступает не одновременно с экспозицией ФС, а значительно позже, что позволяет анализировать ФС-положительные клетки как клетки преимущественно с неповрежденной плазматической мембраной примерно в пределах 30 минут после начала активации.

2.5 Изучение влияния ингибиторов кальпаина на статус интегрина α_{Пь}β₃

При активации тромбоцитов происходит переход интегрина α_{шь}β₃ в активную конформацию, характерную для субпопуляции ФС-отрицательных тромбоцитов, в то время как в субпопуляции ФС-положительных тромбоцитов интегрин α_{Шb}β₃ не представлен в своей активной форме [141]. Поскольку статус интегрина α_{Шь}β₃ может быть связан с кластеризацией самого интегрина α_{Шь}β₃ в мембране тромбоцита, то ингибиторы кальпаина могут быть способны влиять на статус интегрина α_{Шь}β₃ и, возможно, влияют на экспозицию ФС. Был исследован статус интегрина α_{шь}β₃ в субпопуляциях активированных тромбоцитов в присутствии ингибиторов кальпаина (Рис. 15). Тромбоциты преинкубировали с ингибиторами кальпаина, затем активировали и исследовали их связывание с флуоресцентно-меченным антителом к активной форме интегрина антителом к активной антитело ФИТЦ). Помимо этого было исследовано влияние ингибиторов кальпаина на экспозицию ФС, протекающую при активации тромбоцитов (Рис. 15) и на формирование микровезикул, протекающее при активации тромбоцита (Рис. 16). На основании полученных результатов можно говорить о том, что ингибиторы кальпаина не оказывают заметное влияние ни на экспозицию ФС, ни на РАС-ФИТШ формировании субпопуляций связывание антитела при активированных тромбоцитов. В то же время ингибиторы кальпаина заметным образом уменьшали микровезикуляцию, протекающую при активации тромбоцитов (Рис. 16), что полностью согласуется с полученными ранее данными известными из литературы [161, 162]. Таким образом, полученные данные предполагают, что кальпаин не вовлечен в регуляцию экспозиции ФС при активации тромбоцитов и не вовлечен в активацию/дезактивацию интегрина α_{Шb}β₃ при формировании субпопуляций активированных тромбоцитов, но вовлечен в процесс микровезикуляции, который напрямую связан с перестройкой цитоскелета тромбоцитов при их активации.



Рис. 15. Анализ влияния ингибиторов кальпаина на деградацию цитоскелетных белков, экспозицию ФС и связывание антитела к активной форме интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ РАС-1 с субпопуляциями активированных тромбоцитов. Тромбоциты преинкубировали с 0,2% диметилсульфоксида в качестве контроля, 200 мкМ кальпептином, 200 мкМ MDL28170 или PD150606 в течение 60 мин перед их активацией. Приведены результаты типичного эксперимента, n=3. А. Тромбоциты активировали добавлением A23187 до 1 мкМ в течение 10 мин при комнатной температуре. Активированные тромбоциты (10 млн) были осаждены центрифугированием при 1000g (10 мин) и затем тромбоциты ресуспендировали в ДСН-содержащем буфере, пробы кипятили и наносили на 7,5% ДСН-полиакриламидный гель. Приведен типичный профиль белков (1- неактивированные тромбоциты + MDL 28170, 5- активированные тромбоциты + кальпептин, 4 - активированные тромбоциты + MDL 28170, 5- активированные тромбоциты + РD150606). В-D. Тромбоциты активировали добавлением тромбина до 100 нМ в течение 10 мин при комнатной температуре, затем окрашивали РАС1-ФИТЦ и аннексин V–Алекса Флуор 647 и анализировали с помощью проточной цитометрии. Приведены типичные результаты анализа экспозиции ФС при активации тромбоцитов (В) и статуса интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ в субпопуляциях активированных тромбоцитов (С, D).

2.6 Исследование влияния ингибиторов кальпаина на деградацию ряда цитоскелетных белков, задействованных в прикреплении мембранных гликопротеинов к цитоскелету

Использованные в работе ингибиторы кальпаина (кальпептин, MDL28170 и PD150606) имеют различное химическое строение и могут различаться по своей способности ингибировать кальпаин в тромбоцитах. Для анализа эффективности действия использованных ингибиторов кальпаина была протестирована их



Рис. 16. Анализ влияния кальпептина на формирование микровезикул при активации тромбоцитов. Приведен результат типичного эксперимента (n=3). Приведены дот-плоты (БСР – боковое светорассеяние, ПСР – прямое светорассеяние), полученные с помощью проточной цитометрии, для неактивированных, активированных (10 мкМ A23187) и преинкубированных с 200 мкМ ингибитором кальпаина кальпептином активированных (10 мкМ A23187) тромбоцитов. Красным показаны шарики, использованные для калибровки цитометра и точного подсчета количества событий, зеленым выделен регион тромбоцитов (он был определен по неактивированным тромбоцитам) и синим выделен регион микровезикул (MB), который был определен как меньшие по размеру события, чем неактивированные тромбоциты, и одновременно положительные при этом по аннексину V.

способность ингибировать деградацию цитоскелетных белков, протекающую при активации тромбоцитов, с помощью денатурирующего электрофореза в ПААГ (Рис. 15). Тромбоциты предварительно преинкубировали с ингибиторами кальпаина и, затем, активировали добавлением кальциевого ионофора A23187 (соединение, которое способно формировать почти 100% тромбоцитов, которые экспонируют ФС), после этого белковый профиль тромбоцитов анализировали с помощью электрофореза (Рис. 15 А). Полученные результаты свидетельствуют о том, что кальпептин и MDL28170 практически полностью ингибируют протеолитическое расщепление филамина, талина и миозина, наблюдающееся в отсутствии данных ингибиторов, в то время как PD150606 показал себя как наименее эффективный ингибитор протеолиза данных цитоскелетных белков.

2.7 Анализ последовательности событий, протекающих при активации тромбоцитов

Ha данный момент остается неясной последовательность событий, протекающая при активации тромбоцита. Что происходит раньше: экспозиция ФС или разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету? Для анализа последовательности событий, протекающих при экспозиции ФС, была проанализирована кинетика разрушения прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов (Рис. 17). Для такого анализа была разработанная использована ранее методика, основанная на проточной цитометрии, которая анализирует флуоресценцию антител к мембранным белкам на фиксированных тромбоцитах до и после их обработки детергентом. Тромбоциты активировали, затем окрашивали в разное время активации флуоресцентно-меченными антителами к интегрину α_{шь}β₃, фиксировали и обрабатывали детергентом. Анализ дот-плотов и гистограмм флуоресценции показывает, что разрушение прикрепления интегрина α_{Шb}β₃ к цитоскелету



Рис. 17. Анализ кинетики прикрепления интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов. Тромбоциты активировали 100 нМ тромбином с 10 мкг/мл СRP окрашивали одновременно РАС1-ФИТЦ и СD61-ФЭ в течение 2 мин. В соответствующие временные интервалы (2, 5 и 17 мин) тромбоциты фиксировали и обрабатывали раствором детергента. Приведены результаты типичного эксперимента (n = 3): дот-плоты активированных фиксированных тромбоцитов до и после их обработки детергентом (A) и гистограммы флуоресценции CD61-ФЭ для РАС1-отрицательных (РАС1-) активированных тромбоцитов перед (черным) и после (серым) обработки детергентом (B). Выделенная область на дот-плоте показывает область анализированных РАС1- тромбоцитов.

наблюдается только в тромбоцитах отрицательных по связыванию РАС1 (т.е. это тромбоциты положительные по ФС) и процесс разрушения прикрепления мембранных гликопротеинов продолжается после экспонирования ФС (Рис. 17). Данный результат предполагает, что разрушение прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету происходит либо после экспозиции ФС (т.е. является более поздним процессом), либо является процессом параллельным и несвязанным напрямую с экспозицией ФС.

2.8 Анализ разрушения прикрепления мембранных гликопротеинов при экспозиции ФС по поверхности клетки

Активированные тромбоциты имеют неоднородную структуру, например активированный ФС-отрицательный тромбоцит имеет выросты в виде филоподий, в то время как активированный ФС-положительный тромбоцит таких выростов не имеет, однако имеет на своей поверхности особую мембранную область, которая более эффективно, чем вся остальная мембрана, связывает аннексин V, условно названную «шапкой» [163]. Для анализа распределения мембранных гликопротеинов по поверхности клетки до и после обработки детергентом окрашенных антителами к мембранным гликопротеинам и фиксированных тромбоцитов была использована конфокальная микроскопия (Рис. 18). В результате было показано, что разрушение прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов в ФС-положительных тромбоцитах происходит по всей поверхности тромбоцита за исключением специальной мембранной области названной «шапкой» (Рис. 18), Именно в этой области остается флуоресценция интегрина $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, предварительно окрашенного флуоресцентно-меченными антителами для его визуализации, после обработки фиксированных клеток детергентом. Аналогичный результат также был получен для окрашивания ГПІЬ тромбоцитов (данные антителами к не приведены).



Рис. 18. Анализ разрушения прикрепления интегрина α_{IIb}β₃ к цитоскелету в субпопуляциях активированных тромбоцитов с помощью конфокальной микроскопии. Приведены результаты типичного эксперимента (n=3). Приведены типичные конфокальные изображения дифференциального интерфереционного контраста (ДИК), флуоресценции CD61-ФИТЦ и флуоресценции аннексина V-Алексы Флуор 647 для активированных тромбоцитов, иммобилизованных на фибриноген, после их окрашивания антителами, фиксации и обработки детергентом. Стрелкой указан баллон-подобный ФС-положительный тромбоцит и его домен на поверхности, условно называемый «шапкой».

Полученный результат предполагает, что только в этой специальной мембранной области ФС-положительного тромбоцита, названной «шапкой», сохраняется прикрепление адгезионных мембранных гликопротеинов к цитоскелету.

2.9 Адгезия ФС-положительных тромбоцитов

Для проверки гипотезы о том, что разрушение прикрепления к цитоскелету мембранных гликопротеинов способно влиять на адгезивные свойства таких тромбоцитов, мы исследовали способность ФС-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке с иммобилизованным фибриногеном в условиях потока (Рис. 19). Даже при физиологических скоростях сдвига мы наблюдали очень слабую способность ФС-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке (Рис. 19 А,С). Однако, в присутствии ингибиторов кальпаина способность ФС-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока возрастала более чем в 10 раз (Рис. 19 В,С). Полученный результат позволяет говорить о том, что ингибирование разрушения цитоскелета кальпаином приводит к значительной стабилизации способности тромбоцитов сопротивляться воздействию потока.

Неактивированные тромбоциты способны прикрепляться к пожложке с иммобилизованным ффВ в условиях потока (Рис. 19 D). В то время как ФСположительные тромбоциты весьма слабо не только удерживаются на подложке в условиях потока, но и прикрепляются к ней (Рис. 19 D). Было исследовано также влияние ингибиторов кальпаина на способность тромбоцитов прикрепляться к иммобилизованному ффВ в условиях потока (Рис. 19 D). Ингибиторы кальпаина не оказали никакого заметного влияния на способность тромбоцитов Полученный прикрепляться подложке. результат показывает, К ЧТО ингибирование кальпаина не восстанавливает способность ФС-положительных тромбоцитов взаимодействовать с иммобилизованным ффВ в условиях потока, как это характерно, например, для неактивированных тромбоцитов (Рис. 19).



Рис. 19. Анализ способности ФС-положительных тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока и прикрепляться к подложке в отсутствии и в присутствии ингибитора кальпаина MDL28170. Приведены результаты типичного эксперимента (n=3). Типичные конфокальные изображения ДИК, флуоресценции аннексина V-ФИТЦ для активированных тромбоцитов преинкубированных с 0,2% ДМСО в качестве контроля (A) или MDL28170 (B), которые были иммобилизованы на фибриноген и затем подвергнуты воздействию потока со скоростями сдвига 500, 1000 и 4000 с⁻¹ (n = 3). Приведена типичная зависимость количества активированных тромбоцитов, остающихся иммобилизоваными на фибриногеновой подложке в условиях воздействия потока (C). Тромбоциты были преинкубированы с 0,2 % ДМСО (контроль) или MDL28170. Приведена зависимость количества тромбоцитов прикрепляющихся к иммобилизованных преинкубированных с MDL28170 тромбоцитов (D). Количество прикрепившихся к подложке тромбоцитов было нормализовано на количество прикрепившихся неактивированных и активированных преинкубированных с MDL28170 тромбоцитов (D). Количество прикрепившихся к подложке тромбоцитов было нормализовано на количество прикрепившихся неактивированных тромбоцитов. Данные представлены в виде среднего ± ст. откл. для 13 полей зрения.

Глава III. Обсуждение результатов

Основным результатом данной работы является обнаружение эффекта мембранных разрушения прикрепления адгезионных гликопротеинов К цитоскелету в субпопуляции ФС-положительных активированных тромбоцитов, в время ФС-отрицательных активированных тромбоцитах то как В И тромбоцитах адгезионные неактивированных мембранные гликопротеины прикреплены к цитоскелету. В работе показано также, что разрушение адгезионных мембранных гликопротеинов прикрепления контролируется приемущественно кальций-активируемой протеазой кальпаином и регулирует способность тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока.

Основной предпосылкой для данного исследования было то, что суспензия активированных тромбоцитов сильной физиологической при активации разделяется субпопуляции активированных тромбоцитов: ΦCдве на отрицательные и ФС-положительные. ФС-положительные тромбоциты обычно связыванию аннексина V (белок, который специфично детектируют по взаимодействует с липидом мембраны ФС), однако для исследования состояния цитоскелета необходима обработка детергентом, которая приводит к удалению плазматической мембраны и невозможности детектировать ФСлипидов положительные тромбоциты по связыванию аннексина V. Поэтому в данной работе для разделения субпопуляций активированных тромбоцитов с помощью проточной цитометрии на ФС-положительную и ФС-отрицательную было свойство ФС-отрицательных тромбоцитов связывать РАС-1 использовано (антитело к активированной форме интегрина α_{Шb}β₃) в то время как ФСположительная субпопуляция тромбоцитов не связывает РАС-1 [141].

В данной работе был предложен новый подход для анализа прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету, который основывается на обработке неионным детергентом Тритоном X-100 фиксированных клеток для удаления

62

мембраны липидов И неприкрепленных К цитоскелету мембранных белков, при этом предварительно, перед фиксацией, клетки окрашивают флуоресцентно-меченными антителами к соответствующим мембранным гликопротеинам для их визуализации с помощью проточной цитометрии конфокальной микроскопии. Окрашивание мембранных ИЛИ гликопротеинов флуоресцентно-меченными антителами к ним позволяет регистрировать их флуоресценцию до и после обработки фиксированных клеток ee. Падение флуоресценции детергентом И сравнивать ОТ окрашенных белков после обработки фиксированных клеток мембранных детергентом свидетельствует о том, что данный мембранный белок вымывается из мембраны при обработке детергентом, в то время как прикрепленные к цитоскелету мембранные белки будут сохранять свою флуоресценцию на фиксированных клетках и после их обработки детергентом. Подобное явление вымывания мембранных белков с поверхности фиксированных клеток после их обработки детергентом было продемонстрировано для культивируемых клеток животных [157]. Данный подход принципиально отличается от наблюдения эффекта шеддинга мембранных белков (отщепления мембранных белков с поверхности клетки специфичным ферментом), поскольку данный метод включает в себя фиксацию клеток и их последующую обработку детергентом, а шеддинг наблюдается без всякого дополнительного вмешательства и детектируется с проточной цитометрии просто уменьшению помощью ПО количества флуоресцентно-окрашенных белков на мембране клетки или с помощью вестернблотта по появлению в растворе соответствующего фрагмента мембранного белка.

Полученные результаты, касающиеся разрушения прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов к цитоскелету, согласуются с ранее полученными результатами, которые показывают корреляцию между деградацией цитоскелетных белков и протромбиназной активностью (которая напрямую связана с экпозицией ФС на внешней мембране тромбоцита) [152]. Кроме этого, в

более ранних работах было показано, что внутренняя структура прокоагулянтных тромбоцитов лишена отчетливо различимых структур [164]. Однако, все эти данные были непрямыми и не несли прямой информации о связи мембранных гликопротеинах с цитоскелетом как в ФС-положительных так и в субпопуляции ФС-отрицательных активированных тромбоцитов.

Р-селектин одной является ИЗ ключевых адгезионных молекул активированных тромбоцитов, которая регулирует взаимодействие тромбоцитов и лейкоцитов [165], и, таким образом, предположительно он должен быть связан с тромбоцитарным цитоскелетом подобно другим адгезионным молекулам. Однако, Р-селектин оставался единственным ИЗ основных адгезионных молекул тромбоцитов ассоциация которого с цитоскелетом не была исследована до настоящего момента. В данной работе показано, что Р-селектин, подобно другим адгезионным молекулам, ассоциирован с цитоскелетом в активированных ФСтромбоцитах, в то в ФС-положительных отрицательных время как активированных тромбоцитах связь Р-селектина с цитоскелетом практически разрушена (Рис. 10). Р-селектин отличается от других адгезионных молекул тромбоцитов тем, что исходно он сконцентрирован в α-гранулах тромбоцитов и появляется на внешней мембране тромбоцитов только после их агонистиндуцируемой активации. Таким образом, активация тромбоцитов должна приводить каким-то образом к прикреплению Р-селектина к цитоскелету и потом разрушению этого прикрепления при дальнейшей экспозиции ФС на мембране тромбоцита, для установления таких деталей необходимо дальнейшее исследование механизмов, которые контролируют эти процессы.

Несмотря на значительные различия в механизмах, обеспечивающих прикрепление интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ и ГПІb, их прикрепление одинаково разрушается при участии кальпаина, что предполагает существование универсального механизма разрушения такого прикрепления мембранных белков к цитоскелету, который запускается активированным кальпаином. Это предположение согласуется с более ранними данными, показывающими, что активация кальпаина

тесно связана С заметным уменьшением тромбоцитарнозависимой ретракции фибринового сгустка, причем в присутствии ингибиторов кальпаина наблюдали восстановление ретракции [166]. Однако, в то же время полный дефицит у мышей по µ-кальпаину приводит к значительному уменьшению агрегации тромбоцитов и ретракции сгустка [167], что предполагает значительно более сложную функцию для такой протеазы как кальпаин в тромбоцитах. Следует также отметить, что три основных цитосклетных белка (талин, филамин и миозин) изученные в данной работе крайне далеки от всего ряда цитоскелетных белков, задействованных в адгезии тромбоцитов и обеспечивающих прикрепление мембранных гликопротеинов к цитоскелету, которые к тому же подвергаются множественным модификациям, в которых кальпаин-опосредованный протеолиз – это только одна из большого числа возможностей. Дальнейшие исследования, безусловно, необходимы ДЛЯ получения более детальной картины о том, как все эти множественные белки регулируются в субпопуляциях активированных тромбоцитов.

В ранних работах было показано, что способность различных активаторов индуцировать экспозицию ФС коррелирует с деградацией цитоскелетных белков филамина, талина и миозина, регистрируемой по электрофорезу [161]. Полученные в моей работе результаты также показывают, что деградация цитоскелетных белков происходит только в ФС-положительных активированных тромбоцитах, но не в ФС-отрицательной субпопуляции. Данные моей работы также хорошо согласуются с наблюдением о том, что только ФС-положительные тромбоциты содержат активированный кальпаин [168].

В соответствии с ранее полученными результатами [169, 170] в данной работе не было зарегистрировано ингибирование экспозиции ФС при агонистиндуцируемой активации тромбоцитов в присутствии ингибиторов кальпаина (Рис. 15). Это предполагает, что кальпаин не вовлечен в экспозицию ФС, протекающую при активации тромбоцитов. Кальпаин активируется в различных некротических и апоптотических условиях, в то время как активация каспаз

65

происходит только при апоптотическом типе гибели клетки. Недавние исследования показали, что ингибиторы кальпаина способны защищать против некротической нейрональной гибели и, в меньшей степени, при апоптотической гибели клеток [171].

ФС-экспонирующие активированные тромбоциты имеют характерные для гибнущей клетки признаки, такие как: потеря ассиметрии плазматической мембраны и появление на ее внешнем слое ФС, а также потеря целостности плазматической мембраны, падение потенциала в митохондриях тромбоцитов и др. Однако, недавние исследования продемонстрировали, что формирование таких прокоагулянтных тромбоцитов происходит независимо от апоптоза [172], несмотря на то, что тромбоциты могут подвергаться запрограммированной клеточной гибели, такой как апоптоз (например, при удалении тромбоцитов из кровотока их гибель происходит по апоптотическому пути). Помимо этого, было показано, что агонист-индуцируемая экспозиция ФС в тромбоцитах практически полностью зависит от мембранного белка ТМЕМ16-F, в то время как данный мембранный белок не требуется для зависимого от каспаз экспонирования ФС на мембране [173]. Все эти данные в совокупности позволяют предположить, что апоптотическая экспозиция ФС и экспозиция ФС в результате агонистактивации контролируются разными сигнальными индуцируемой путями, приводящими, в итоге, к гибели тромбоцита.

В данной работе формирование микровезикул было зарегистрировано одновременно с формированием ФС-положительных тромбоцитов (Рис. 18), что полностью коррелирует с предыдущими наблюдениями, показывающими, что агонист-индуцированные ФС-положительные тромбоциты высвобождают микровезикулы [174]. Активация кальпаина играет не только ведущую роль в разрушении прикрепления мембранных гликопротеинов к цитоскелету (Рис. 13), но также и в отшнуровывании микровезикул от ФС-положительных тромбоцитов (Рис. 16), что хорошо согласуется с ранее полученными результатами [175]. Можно предположить, что оба эти процесса напрямую связаны с перестройкой

цитоскелета, происходящей в ФС- положительных тромбоцитах. Как показало совсем недавнее исследование, разрушение цитоскелета из микротрубочек тромбоцитов, происходящее при экспозиции ФС, вовлечено в формирование баллон-подобных структур, которые и представляют собой ФСположительные тромбоциты, и такое формирование баллонов коррелирует с микровезикуляцией и прокоагулянтной функцией тромбоцитов [176].

В данной работе разрушение прикрепления мембранных адгезивных гликопротеинов к цитоскелету наблюдали только в ФС-положительных тромбоцитах (Рис. 8-10). Измерения кинетики разрушения прикрепления мембранных гликопротеинов К цитоскелету показали, что разрушение прикрепления продолжается после экспозиции ФС на мембране клетки (Рис. 17). На основании этих результатов можно предположить, что экспозиция ФС предшествует перестройке цитоскелета, происходящей в таких активированных тромбоцитах, однако полученные результаты не исключают вероятности, что экспозиция ФС и кальпаин-опосредованная перестройка цитоскелета являются кальций-регулируемыми, но в то же время независимыми друг от друга процессами. Это предположение также подтверждается ранее полученными данными о том, что экспозиция ФС на мембране тромбоцита во время его активации не зависит от перестройки его цитоскелета [177]. Недавние исследования также показали, что протеолиз β-цепи интегрина кальпаином и экспозиция ФС при активации тромбоцита регулируются различными путями [178].

Данная работа не обнаружила какой-либо роли кальпаина в активации или инактивации интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$, поскольку статус интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ оставался одинаковым как без ингибиторов кальпаина так и в присутствии них (Рис. 15). Этот результат противоречит ранее полученным данным о том, что активация кальпаина выступает одним из регуляторов инактивации интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ в ФСположительных тромбоцитах [179]. Данное противоречие наиболее вероятно

67

связано с тем, что в моей работе и работе Мattheij использовали принципиально отличающуюся обработку данных проточной цитометрии по анализу статуса интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$: в данной работе тромбоциты разделяли на РАС1-положительную и РАС1-отрицательную субпопуляции и анализировали среднюю флуоресценцию именно субпопуляции тромбоцитов, в то время как в работе Mattheij анализировали только процент РАС1-положительных и РАС1-отрицательных тромбоцитов. Однако в совокупности, полученные в моей работе результаты предполагают необходимость ревизии механизмов агрегации/адгезии ФС-положительных прокоагулянтных тромбоцитов, которые выходят за рамки хорошо известного феномена «инактивации интегринов» в прокоагулянтных активированных тромбоцитах.

Проведенные В данной работы эксперименты рамках показали сопротивляемости воздействию ΦCзначительную разницу В потока тромбоцитов, положительных предварительно иммобилизованных на фибриногеновую подложку, в отсутствии и в присутствии ингибиторов кальпаина (Рис. 19). Полученный результат позволяет говорить о том, что кальпаин способен свойства ФС-положительных регулировать адгезивные активированных тромбоцитов как результат того, что он контролирует прикрепление к цитоскелету адгезионных мембранных гликопротеинов тромбоцитов, которое обеспечивает механическую прочность образующегося фокального контакта. В то способность тромбоцитов же время, ИЗ потока прикрепляться К иммобилизованному на подложку ффВ при довольно низкой скорости потока не при преинкубации тромбоцитов в присутствии изменялась ингибиторов кальпаина (Рис. 19). Эти данные в целом хорошо согласуются с полученными ранее результатами, что воздействие потока с патологической скоростью сдвига (5000-40000 с⁻¹) на тромбоциты, имеющие мутантную форму ГПІb (дефект по связыванию с филамином А), приводит к сниженной адгезии таких тромбоцитов к подложке с иммобилизованным ффВ, в то время как при низких скоростях сдвига не наблюдали заметных различий между нормальными и мутантными по ГПІЬ

В тромбоцитами [180]. экспериментах, выполненных В анализу способности данной работе ПО тромбоцитов прикрепляться к иммобилизованному ффВ, была использована крайне низкая скорость сдвига 100 с-1 и даже при такой низкой скорости сдвига способность ФС-положительных тромбоцитов прикрепляться к подложке была крайне низка (Рис. 19). Это может быть связано не только с разрушением прикрепления ГПІВ к цитоскелету в ФСположительных тромбоцитах, но также с инактивацией интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ и с определенными сигнальными событиями, протекающими при экспозиции ФС в таких тромбоцитах. Например, показано, что внутриклеточный домен ГПІВ В свойств комплекса ГПІb-V-IX вовлечен В контроль адгезивных через фосфорилирование Ser¹⁶⁶ в ГПІВ В [181]. И одновременно показано, что образование ФС-положительных тромбоцитов связано с интенсивным дефосфорилированием тирозиновых остатков в соответствующих белках [182]. Дальнейшие исследования необходимы для детализации сигнальных механизмов, приводящих к неспособности ФС-положительных тромбоцитов прикрепляться к подложке в условиях потока.

Таким образом, на данный момент физиологическая роль прокоагулянтных Φ C-положительных тромбоцитов действительно неясна, однако показано, что она сопряжена с пониженным формированием тромбоцитарных тромбов [178, 183]. До недавнего времени парадоксальная инактивация интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ в таких прокоагулянтных тромбоцитах оставалась единственным объяснением такого наблюдаемого эффекта на рост тромбов. Недавно было продемонстрировано, что Φ C-положительные тромбоциты неспособны нормально агрегировать друг с другом, но способны агрегировать с Φ C-отрицательными активированными тромбоцитами [143], причем взаимодействие Φ C-положительных с Φ C-отрицательными тромбоцитами происходит через специализированный домен, расположенный на мембране прокоагулянтного тромбоцита и обогащенный фибрином, который условно был назван «шапкой» [163]. Однако, основной результат данной работы о том, что кальпаин-регулируемое разрушение

прикрепления мембранных адгезионных гликопротеинов К цитоскелету способно сильно снижать их сопротивляемость воздействию потока, предполагает более общий вывод: ни интегрин а_{шь}β₃, ни ГПІb в ФСположительных тромбоцитах не обладают достаточным прикреплением к цитоскелету для того, чтобы тромбоциты удерживались на подложке в условиях потока. Данный результат укрепляет и поддерживает гипотезу о том, что прокоагулянтные тромбоциты являются «слабыми звеньями» в тромбе: они могуть прикрепиться изначально (через их специальный фибрин-обогащенный домен мембраны или через ГПІb еще до того, как они экспонируют ФС на мембране), однако они не смогут удержаться в тромбе, если только они не окружены плотно ФС-отрицательными тромбоцитами или сеткой фибрина. Разрушение прикрепления основных адгезионных гликопротеинов к цитоскелету тромбоцитов в ФС-положительных прокоагулянтных тромбоцитах и, собственно, сама перестройка их цитоскелета делает эти ФС-положительные тромбоциты бесполезными в качестве «несущих компонентов» при формировании тромба. Можно предполагать сейчас только то, что их роль, возможно, ограничивается только регулированием каким-то образом размера формирующегося тромба.

Заключение

В данной работе проанализировано прикрепление основных адгезионных мембранных гликопротеинов (интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$, гликопротеин Ib и P-селектин) к цитоскелету неактивированного тромбоцита и субпопуляций активированных тромбоцитов, исследован механизм, который приводит к разрушению такого прикрепления в субпопуляции фосфатидилсерин-положительных тромбоцитов и показано физиологическое значение прикрепления адгезионных мембранных гликопротеинов для адгезивных свойств тромбоцита. Результаты данной работы расширяют понимание механизмов активации тромбоцитов, свойств субпопуляций тромбоцитов, а также вносят свой вклад в только начинающее развиваться направление о механической функции тромбоцитов.

Выводы

- Разработана методика, на основе анализа флуоресценции мембранных белков с помощью проточной цитометрии, позволяющая анализировать прикрепление мембранных белков к цитоскелету клеток в субпопуляциях активированных тромбоцитов.
- В неактивированных и активированных ФС-отрицательных тромбоцитах мембранные адгезионные белки (интегрин α_{IIb}β₃, гликопротеин Ib и Pселектин) прикреплены к цитоскелету, в то время как в экспонирующих ФС активированных тромбоцитах наблюдается разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету.
- Разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету в ФС-положительных тромбоцитах коррелирует с протеолитической деградацией ряда цитоскелетных белков (таких как филамин и талин), которые участвуют в прикреплении мембранных белков к цитоскелету тромбоцитов.
- Разрушение прикрепления мембранных адгезионных белков к цитоскелету, наблюдающееся в экспонирующих ФС активированных тромбоцитах, контролируется в основном кальций-зависимой протеазой кальпаином.
- 5. Кальпаин-контролируемое разрушение прикрепления адгезионных белков к цитоскелету приводит к неспособности экспонирующих ФС тромбоцитов удерживаться на подложке в условиях потока.
Глава IV. Материалы и методы

4.1 Реактивы, использованные в работе

Тромбин, фактор фон Виллебранда (ффВ, Haematologic Technologies, США); простагландин E1 (MP Biochemicals); аннексин V конъюгированный с Алекса Флуор 647, коньюгированное с фикоэритрином (ФЭ) CD61, CD61–Алекса Флуор 647, CD42b-ФЭ и CD62P-ФЭ (Biolegend); конъюгированное с (BD флуоресцеинизотиоцитнатом (ФИТЦ) антитело PAC-1 **Biosciences**): кальпептин, MDL28170, PD150606 (Tocris Bioscience). Ацетоксиметиловый эфир (Molecular Probes, США). A23187 (кальциевый кальцеина ионофор), бромфеноловый синий, бычий сывороточный альбумин (БСА), D-глюкоза, глицерин, глицин, додецилсульфат натрия (ДСН), дигидрофосфат натрия, диметилсульфоксид (ДMCO), **HEPES** (4-(2-hydroxyethyl)-1piperazineethanesulfonic acid, 4-(2-оксиэтил)1-пиперазин этансульфоновая кислота), N,N'-метилен-бис-акриламид, β-меркаптоэтанол, Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, 2-амино-2-оксиметил-1,3-пропандиол), параформальдегид, персульфат аммония, полакриламид, Сефароза CL-2B, **TEMED** (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'тетраметилэтилендиамин), Тритон Х-100, хлорид калия, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид натрия (Sigma-Aldrich, США). Коллаген-подобный пептид (collagen-related peptide, CRP) был предоставлен профессором R.W. Farndale (University of Cambridge, Великобритания).

4.2 Оборудование, использованное в работе

Тромбоциты анализировали на проточных цитометрах FACSCalibur (BD Biosciences) или Accuri C6 (Accuri Cytometers, BD Biosciences). Полученные на проточных цитометрах данные анализировали с помощью программ WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute) или Cflow (Accuri Cytometers). Сортировку клеток выполняли на проточном цитометре с системой клеточной

сортировки BD FACSAria II (BD Biosciences). Для получения флуоресцентных конфокальных изображений использовали микроскоп Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) со 100х объективом. Полученные изображения анализировали с использованием программы ImageJ. Элекрофорез белков проводили на вертикальной камере для электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США) с источником питания (Bio-Rad, США) или камере (Bio-Rad, США).

4.3 Получение отмытых от белков плазмы тромбоцитов

Кровь забирали на 110 мМ цитрат натрия в соотношении кровь:цитрат 9:1. Затем в кровь, для предотвращения активации тромбоцитов в процессе их выделения, добавляли апиразу (до 0,1 ед/мл) и простагландин Е1 (до 1 мкМ). После этого, для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали 8 мин при 100g. Полученную богатую тромбоцитами плазму смешивали со 110 мМ цитратом натрия, рН 5,5 в соотношении плазма:цитрат натрия 3:1 для предотвращения агрегации тромбоцитов в процессе их осаждения центрифугированием на следующем этапе ИХ выделения. После ЭТОГО обогащенную тромбоцитами плазму центрифугировали 5 мин при 400g. Полученный осадок тромбоцитов ресуспендировали в буфере А (150 мМ хлорид натрия, 2,7 мМ хлорид калия, 1 мМ хлорид магния, 0,4 мМ дигидрофосфат натрия, 20 мМ HEPES, 5 мМ глюкоза, 0,5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), рН 7,4) и затем очищали тромбоциты гель-фильтрацией в том же буфере на колонке с Сефарозой CL-2В от оставшихся белков плазмы. Полученные очищенные тромбоциты разводили до нужной концентрации в буфере А и для сенситизации простаноидного рецептора выдерживали не менее 1 часа при комнатной температуре до постановки всех экспериментов.

4.4 Активация тромбоцитов

Тромбоциты разбавляли в буфере А до концентрации 100 тыс/мкл, затем добавляли активационную смесь, так, что конечная концентрация тромбоцитов при активации составляла 50 тыс/мкл. В качестве активаторов использовали в

различных концентрациях тромбин, тромбин вместе с СRР или кальциевый ионофор A23187. Активацию тромбоцитов проводили при комнатной температуре в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция без какого-либо перемешивания.

4.5 Инкубация тромбоцитов с антителами

Тромбоциты инкубировали с флуоресцентно-меченными антителами к активной форме интегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ (РАС-1–ФИТЦ) и к таким поверхностным гликопротеинам как интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ (его неактивная форма), гликопротеин Ib и Рселектин (СD61–ФЭ, CD42b–ФЭ или CD62P–ФЭ, соответственно) при комнатной температуре. Двойное окрашивание тромбоцитов одновременно маркером на ФС (Алекса Флуор 647–аннексин V) и антителами против активной формы инегрина $\alpha_{IIb}\beta_3$ (РАС-1–ФИТЦ) использовали для регистрации образования субпопуляций активированных тромбоцитов.

4.6 Проточная цитометрия

Неактивированные или активированные тромбоциты для анализа на проточном цитометре разводили буфером А до концентрации 1-5 тыс/мкл и анализировали в течение 1-2 мин на цитометре при медленной скорости потока. В случае анализа экспозиции ФС на активированных тромбоцитах в буфер А добавляли хлорид кальция до концентрации 2,5 мМ, поскольку детекция ФС с помощью аннексина V возможна только в присутствии ионов кальция.

4.7 Сортировка тромбоцитов

Активированные тромбоциты окрашивали аннексином V – Алексой Флуор 647 в течение 5 мин при комнатной температуре и затем анализировали в системе проточного цитометра с функцией сортировки клеток, где тромбоциты были разделены на ФС-положительные и ФС-отрицательную субпопуляции на основании связывания ими флуоресцентно-меченного аннексина V.

4.8 Анализ разрушения прикрепления мембранных гликопротеитнов к цитоскелету тромбоцитов в субпопуляциях активированных тромбоцитов с помощью конфокальной микроскопии

Предварительно очищенные стеклянные покровные стекла (24х24 мм) были инкубированы с фибриногеном (10 мг/мл) в течение 40 мин при комнатной температуре, затем стекла с иммобилизованным фибриногеном промывали дистиллированной водой и вставляли в проточную камеру. После этого, для блокирования неспецифического связывания, стекла инкубировали с 0,5% БСА в течение 30-60 мин при комнатной температуре. Очищенные гель-фильтрацией тромбоциты в концентрации 200 тыс/мкл инкубировали с покрытыми таким способом фибриногеном стеклами в течение 10 мин при комнатной температуре в буфере А для их прикрепления к подложке.

Затем проточную камеру промывали буфером А при 100 с⁻¹ для удаления из камеры несвязавшихся с подложкой тромбоцитов. После этого оставшиеся прикрепленными тромбоциты активировали 100 нМ тромбином с 10 мкг/мл СRP в течение 20 мин, после активации тромбоциты инкубировали с аннексином V – Алексой Флуор 647 и CD61-ФИТЦ или CD42b-ФИТЦ в течение 10 мин для визуализации ФС-положительных тромбоцитов и мембранных гликопротеинов. Затем тромбоциты фиксировали 40 мин 1% раствором параформальдегида в буфере А без БСА и обрабатывали в течение 10 мин 0,1% раствором Тритона X-100. На каждом этапе тромбоциты визуализировали с помощью кофокального микроскопа Axio Observer.Z1 со 100х объективом.

4.9 Анализ сопротивляемости тромбоцитов,

иммобилизованных на подложке, к воздействию потока

Предварительно очищенные стеклянные покровные стекла (24х24 мм) были инкубированы с фибриногеном (10 мг/мл) в течение 40 мин при комнатной

иммобилизованным фибриногеном температуре, затем стекла с промывали дистиллированной водой и вставляли в проточную камеру. Очищенные гель-фильтрацией тромбоциты в концентрации 200 тыс/мкл инкубировали 5 мин с CD61-Алекса Флуор 647 для окраски тромбоцитов и, затем, подавали в проточную камеру при 100 с⁻¹, инкубировали в камере с покрытым фибриногеном стеклом в отсутствии потока в течение 20 мин при комнатной температуре для иммобилизации тромбоцитов на подложку. Затем неприкрепившиеся к стеклу тромбоциты удаляли из камеры с помощью промывки камеры буфером А при низкой скорости потока (100 с⁻¹) и, после этого, прикрепившиеся тромбоциты инкубировали еще дополнительно 20 мин для их полного распластывания на стекле, покрытом фибриногеном. Затем тромбоциты инкубировали с 0,2% ДМСО (контроль) или с 200 мкМ MDL28170 в буфере А в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого тромбоциты активировали подачей в камеру 10 мкМ А23187 в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция в течение 10 мин, активированные тромбоциты окрашивали инкубацией с аннексин V-ФИТЦ (3 мин) для визуализации ФС-положительных тромбоцитов. Затем тромбоциты подвергали воздействию потока co ступенчатоувеличивающейся скоростью 300, 500, 1000, 1500 и 2000 с⁻¹ в течение 2 мин и 4000, 6000 и 9000 с⁻¹ в течение 1 мин. На каждой стадии тромбоциты визуализировали конфокальной микроскопией с помощью микроскопа Axio Observer.Z1 со 100х объективом.

4.10 Анализ способности тромбоцитов прикрепляться в потоке

Предварительно очищенные стеклянные покровные стекла (24х24 мм) были инкубированы с ффВ (100 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение 12 часов при +4°C, затем стекла с иммобилизованным ффВ промывали дистиллированной водой, блокировали с 0,5% БСА (1 час при комнатной температуре) и вставляли в проточную камеру. Очищенные гель-фильтрацией тромбоциты в концентрации 300 тыс/мкл были преинкубированы с 0,2% ДМСО (контроль) или 200 мкМ MDL28170 в течение 60 мин при комнатной температуре,

затем тромбоциты окаршивали CD61–Алекса Флуор 647 (20 мин), активировали 10 мкМ A23187 в присутствии 2,5 мМ хлорида кальция в течение 20 мин и после всего этого эти тромбоциты пропускали через проточную камеру в буфере A при скорости сдвига 100 с⁻¹ в течение 10 мин. Затем камеру промывали с буфером A (3 мин) для удаления несвязавшихся тромбоцитов и прикрепившиеся тромбоциты визуализировали с помощью конфокальной микроскопии, используя микроскоп Axio Observer.Z1 со 100х объективом (было отснято 20 различных полей зрения по всей площади стекла с иммобилизованным ффВ в проточной камере).

Список сокращений

- АДФ аденозиндифосфат
- ГП гликопротеин
- ДИК дифференциально-интерфереционный контраст
- ДМСО диметилсульфоксид
- ДСН додецилсульфат натрия
- ПААГ полиакриламидный гель
- ФС фосфатидилсерин
- ффВ фактор фон Виллебранда
- ФИТЦ флуоресцеинизотиоционат
- ФЭ фикоэритрин
- CRP (collagen-related peptide) коллаген-подобный пептид

Список литературы:

1 Mustard, J.F. Platelets, thrombosis and drugs / J.F. Mustard, M.A. Packham // Drugs. – 1975. – Vol. 9, N 1. – P. 19-76.

2 Gibbins, J.M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation / J.M. Gibbins // J. Cell Sci. – 2004. Vol. 117, N 16. – P. 3415-3425.

3 Alevriadou, B.R. Real-time analysis of shear-dependent thrombus formation and its blockade by inhibitors of von Willebrand factor binding to platelets / B.R. Alevriadou, J.L. Moake, N.A. Turner, Z.M. Ruggeri, B.J. Folie, M.D. Phillips, A.B. Schreiber, M.E. Hrinda, L.V. McIntire // Blood. – 1993. Vol. 81, N 5. – P. 1263-1276.

4 Ruggeri, Z.M. Mechanisms initiating platelet thrombus formation / Z.M. Ruggeri // Thromb. Haemost. – 1997. Vol. 78, N 1. – P. 611-616.

5 Savage, B. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor / B. Savage, E. Saldivar, Z. Ruggeri / Cell. – 1996. Vol. 84, N 2. – P. 289-297.

6 Sixma, J. J. Platelet adhesion to collagen: an update / J.J. Sixma, G.H. van-Zanten, E.G. Huizinga, R.M. vanderPlas, M. Verkley, Y.P. Wu, P. Gros, P.G. deGroot // Thromb. Haemost. – 1997. Vol. 78, N 1. – P. 434-438.

7 Moroi, M. Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: The involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion / M. Moroi, S. M. Jung, K. Shinmyozu, Y. Tomiyama, A. Ordinas, M. Diaz-Ricart // Blood. – 1996. Vol. 88, N 6. – P. 2081-2092.

8 Saelman, E. U. M. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ -integrin) / E.U.M. Saelman, H.K. Nieuwenhuis, K.M. Hese, P.G. Degroot, H.F.G. Heijnen, E.H. Sage, S. Williams,

L. McKeown, H.R. Gralnick, J.J. Sixma // Blood. – 1994. – Vol. 83, N 5. – P. 1244-1250.

9 Staatz, W. D. The membrane glycoprotein Ia-IIa (Vla-2) complex mediates the Mg++-dependent adhesion of platelets to collagen / W.D. Staatz, S.M. Rajpara, E.A. Wayner, W.G. Carter, S.A. Santoro // J. Cell Biol. – 1989. – Vol. 108, N 5. – P. 1917-1924.

10 Kato, K. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion / K. Kato, T. Kanaji, S. Russell, T.J. Kunicki, K. Furihata, S. Kanaji, P. Marchese, A. Reininger, Z. Ruggeri, M. J. Ware // Blood. – 2003. – Vol. 102, N 5. – P. 1701-1707.

11 Massberg, S. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo / S. Massberg, M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlnhofer, U. Heinzmann, B. Nieswandt // J. Exp. Med. – 2003. – Vol. 197, N 1. – P. 41-49.

12 Stalker, T.J. Platelet signaling / T.J. Stalker, D.K. Newman, P. Ma, K.M. Wannemacher, L.F. Brass // Handb. Exp. Pharmacol. – 2012. – Vol. 210. – P. 59-85.

13 Yang, J. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors / J. Yang, J. Wu, H. Jiang, R. Mortensen, S. Austin, D.R. Manning, D. Woulfe, L.F. Brass // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, N 48. – P. 46035–46042.

14 Reininger, A.J. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress / A.J. Reininger, H.F. Heijnen, H. Schumann, H.M. Specht, W. Schramm, Z.M. Ruggeri // Blood. – 2006. – Vol. 107, N 9. – P. 3537–3545.

15 Ruggeri, Z.M. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress / Z.M. Ruggeri, J.N. Orje, R. Habermann, A.B. Federici, A.J. Reininger // Blood. – 2006. – Vol. 108, N 6. – P. 1903–1910.

16 Nesbitt, W.S. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation / W.S. Nesbitt, E. Westein, F.J. Tovar-Lopez, E. Tolouei, A. Mitchell, J. Fu, J. Carberry, A. Fouras, S.P. Jackson // Nat. Med. – 2009. – Vol. 15, N 6. – P. 665-673.

17 Bellido-Martín, L. Imaging fibrin formation and platelet and endothelial cell activation in vivo / L. Bellido-Martín, V. Chen, R. Jasuja, B. Furie, B.C. Furie // Thromb. Haemost. – 2011. – Vol. 105, N 5. P. 776-782.

18 Brass, L.F. Regulating thrombus growth and stability to achieve an optimal response to injury / L.F. Brass, K.M. Wannemacher, P. Ma, T.J. Stalker // J. Thromb. Haemost. – 2011. – Vol. 9, N Suppl 1. – P. 66-75.

19 Radomski, M. W. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium / M.W. Radomski, R.M.J. Palmer, S. Moncada // Lancet. – 1987. – Vol. 330, N. 8567. – P. 1057-1058.

20 Geiger, J. Inhibitors of platelet signal transduction as anti-aggregatory drugs / J. Geiger // Expert Opin. Investig. Drugs. – 2001. – Vol. 10, N 5. – P. 865-890.

21 Cicmil, M. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets / M. Cicmil, J.M. Thomas, M. Leduc, C. Bon, J.M. Gibbins // Blood. – 2002. – Vol. 99, N 1. – P. 137-144.

22 Jones, K.L. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 is a negative regulator of platelet-collagen interactions / K.L.Jones, S.C. Hughan, S.M. Dopheide, R.W. Farndale, S.P. Jackson, D.E. Jackson // Blood. – 2001. – Vol. 98, N 5. – P. 1456-1463.

23 Zhao, T.M. Integrin activation by regulated dimerization and oligomerization of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1 from within the cell / T.M. Zhao, P.J. Newman // J. Cell Biol. -2001. - Vol. 152, N 1. - P. 65-73.

24 Rathore, V. PECAM-1 negatively regulates GPIb/V/IX signaling in murine platelets / V. Rathore, M.A. Stapleton, C.A. Hillery, R.R. Montgomery, T.C. Nichols, E.P. Merricks, D.K. Newman, P.J. Newman // Blood. – 2003. – Vol. 102, N 10. – P. 3658-3664.

25 Luo, S-Z. Glycoprotein Ibα forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibβ subunits in the resting platelet / S-Z. Luo, X. Mo, V. Afshar-Kharghan, S. Srinivasan, J.A. Lopez, R Li // Blood. – 2007. – Vol. 109, N 2. – P. 603–609.

26 Gardiner, E.E. Structure and function of platelet receptors initiating blood clotting / E.E. Gardiner, R.K. Andrews // Adv. Exp. Med. Biol. – 2014. – Vol. 844. – P. 263-275.

27 Nieuwenhuis, H.K. Human-blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein-Ia / H.K. Nieuwenhuis, J.W.N. Akkerman, W.P.M. Houdijk, J.J. Sixma // Nature. – 1985. – Vol. 318, N 6045. – P. 470-472.

28 Santoro, S.A. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen / S.A. Santoro // Cell. – 1986. – Vol. 46, N 6. – P. 913-920.

29 Kunicki, T.J. The human fibroblast class-II extracellularmatrix receptor mediates platelet-adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein-Ia-IIa complex / T.J. Kunicki, D.J. Nugent, S. J. Staats, R.P. Orchekowski, E.A. Wayner, W.G. Carter // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263, N 10. – P. 4516-4519.

30 Santoro, S.A. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to VLA-2 / S.A. Santoro, S.M. Rajpara, W.D. Staatz, V.L. Woods Jr, // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1988. – Vol. 153, N 1. – P. 217-223. 31 Sixma, J.J. Platelet adhesion to collagen / J.J. Sixma, G.H. van-Zanten, , E. U. Saelman, M. Verkleij, , H. Lankhof, , H.K. Nieuwenhuis, P.G. de-Groot // Thromb. Haemost. – 1995. – Vol. 74, N 1. – P. 454-459.

32 Sixma, J.J. Platelet adhesion to collagen: an update / J.J. Sixma, G.H. van-Zanten, E.G. Huizinga, R.M. vanderPlas, M. Verkley, Y.P. Wu, P. Gros, P.G. deGroot // Thromb. Haemost. – 1997. – Vol. 78, N 1. – P. 434-438.

33 Inoue, O. Integrin $\alpha_2\beta_1$ mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC-gamma 2 / O. Inoue, K. Suzuki-Inoue, W.L. Dean, J. Frampton, S. P. Watson // J. Cell. Biol. – 2003. –Vol. 160, N 5. – P. 769-780.

34 Razdan, K. Shear-stress-induced von Willebrand factor binding to platelets causes the activation of tyrosine kinases / K. Razdan, J.D. Hellums, M.H. Kroll // Biochem. J. – 1994. – Vol. 302, N Pt 3. – P. 681-686.

35 Ozaki, Y. Protein-tyrosine phosphorylation in human platelets induced by interaction between glycoprotein Ib and von Willebrand factor / Y. Ozaki, K. Satoh, Y. Yatomi, S. Miura, Y. Fujimura, S. Kume // Biochim. Biophys. Acta. – 1995. – Vol. 1243, N 3. – P. 482-488.

36 Asazuma, N. Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets / N. Asazuma, Y. Ozaki, K. Satoh, Y. Yatomi, M. Handa, Y. Fujimura, S. Miura, S. Kume // Blood. – 1997. – Vol. 90, N 12. – P. 4789-4798.

37 Kroll, M.H. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation / M.H. Kroll, T.S. Harris, J.L. Moake, R.I. Handin, A.I. Schafer // J. Clin. Invest. – 1991. – Vol. 88, N 5. – P. 1568-1573.

38 Mazzucato, M. Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ib α mechanoreceptor / M. Mazzucato, P.

Pradella, M.R. Cozzi, L. de Marco, Z.M. Ruggeri // Blood. – 2002. – Vol. 100, N 8. – P. 2793-2800.

39 Milner, E.P. Ristocetin-mediated interaction of human von Willebrand factor with platelet glycoprotein Ib evokes a transient calcium signal: observations with Fura-PE3 / E.P. Milner, Q. Zheng, J.C. Kermode J. C. // J. Lab. Clin. Med. – 1998. – Vol. 131, N 1. – P. 49-62.

40 Nesbitt, W.S. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent calcium signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow / W.S. Nesbitt, S. Kulkarni, S. Giuliano, I. Goncalves, S.M. Dopheide, C.L. Yap, I.S. Harper, H.H. Salem, S. P. Jackson // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, N 4. – P. 2965-2972.

41 Yap, C.L. Synergistic adhesive interactions and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Studies in human platelets and transfected Chinese hamster ovary cells / C.L. Yap, S.C. Hughan, S.L. Cranmer, W.S. Nesbitt, M.M. Rooney, S. Giuliano, S. Kulkarni, S.M. Dopheide, Y.P. Yuan, H.H. Salem, S.P. Jackson // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, N 52. – P. 41377-41388.

42 Li, Z. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation / Z. Li, X. Xi, M. Gu, R. Feil, R.D. Ye, M. Eigenthaler, F. Hofmann, X. Du // Cell. – 2003. – Vol. 112, N 1. – P. 77-86.

43 Jackson, S.P. Adhesion receptor activation of phosphatidylinositol 3-kinase – Von Willebrand factor stimulates the cytoskeletal association and activation of phosphatidylinositol 3-kinase and pp60^{c-src} in human platelets / S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder, Y.P. Yuan, I. Rabinowitz, H.H. Salem, C.A. Mitchell // J. Biol. Chem. – 1994. – Vol. 269, N 43. – P. 27093-27099.

44 Munday, A.D. Phosphoinositide 3-kinase forms a complex with platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex and 14-3-3zeta / A.D. Munday, M.C. Berndt, C.A. Mitchell // Blood. – 2000. – Vol. 96, N 2. – P. 577-584.

45 Torti, M. Rap1B and Rap2B translocation to the cytoskeleton by von Willebrand factor involves Fc gamma II receptor-mediated protein tyrosine phosphorylation / M. Torti, A. Bertoni, I. Canobbio, F. Sinigaglia, E.G. Lapetina, C. Balduini // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 19. – P. 13690-13697.

46 Yuan, Y.P. The von Willebrand factor-glycoprotein Ib/V/IX interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein Ib/V/IX-transfected cells / Y.P. Yuan, S. Kulkarni, P. Ulsemer, S.L. Cranmer, C.L. Yap, W.S. Nesbitt, I. Harper, N. Mistry, S.M. Dopheide, S.C. Hughan, , D. Williamson, C. de la Salle, H.H. Salem, F. Lanza, S.P. Jackson // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 51. – P. 36241-36251.

47 Moake, J.L. Shear-induced platelet-aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine-diphosphate, and is resistant to aspirin / J.L. Moake, N.A. Turner, N.A. Stathopoulos, L. Nolasco, J.D. Hellums // Blood. – 1988. – Vol. 71, N 5. – P. 1366-1374.

48 Cunningham, J.G. The cytoplasmic domain of the alpha-subunit of glycoprotein (GP) Ib mediates attachment of the entire GP Ib-IX complex to the cytoskeleton and regulates von Willebrand factor-induced changes in cell morphology / J.G. Cunningham, S.C. Meyer, J.E.B. Fox // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, N 19. – P. 11581-11587.

49 Andrews, R.K. Glycoprotein Ib-IX-V / R.K. Andrews, E.E. Gardiner, Y. Shen, J.C. Whisstock, M.C. Berndt // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2003. – Vol. 35, N 8. – P. 1170–1174.

50 Canobbio, I. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex / I. Canobbio, C. Balduini, M. Torti // Cell Signal. – 2004. – Vol. 16, N 12. – P. 1329–1344.

51 López, J.A. Bernard-Soulier syndrome / J.A. López, R.K. Andrews, V. Afshar-Kharghan, M.C. Berndt // Blood. – 1998 - Vol. 91, N 12. – P. 4397–4418.

52 Cranmer, S.L. High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIbα-filamin interaction / S.L. Cranmer, K.J. Ashworth, Y. Yao, M.C. Berndt, Z.M. Ruggeri, R.K. Andrews, S.P. Jackson // Blood. – 2011. – Vol. 117, N 9. – P. 2718–2727.

53 Dicker, I.B. Both the high affinity thrombin receptor (GPIb-IX-V) and GPIIb/IIIa are implicated in expression of thrombin-induced platelet procoagulant activity / I.B. Dicker, D.L. Pedicord, D.A. Seiffert, G.A. Jamieson, N.J. Greco // Thromb Haemost. -2001. - Vol. 86, N 4. - P. 1065-1069.

54 Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines / R.O. Hynes // Cell. – 2002. – Vol. 110, N 6. – P. 673-687.

55 Kato, A. The biologic and clinical spectrum of Glanzmann's thrombasthenia: implications of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ for its pathogenesis / A Kato // Crit. Rev. Oncol. Hematol. – 1997. – Vol. 26, N 1. – P. 1-23.

56 Coller, B.S. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics / Coller BS // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol. 99, N 7. – P. 1467-1471.

57 Scarborough, R.M. Platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonists as prototypical integrin blockers: novel parenteral and potential oral antithrombotic agents / R.M. Scarborough, D.D.Gretler // J. Med. Chem. – 2000. – Vol. 43, N 19. – P. 3453-3473.

58 Watson, S.P. GPVI and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling in platelets / S.P. Watson, J.M. Auger, O.J. McCarty, A.C. Pearce // J. Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 3, N 8. – P. 1752–1762.

59 Coller, B.S. The GPIIb/IIIa (integrin alphaIIbbeta3) odyssey: a technologydriven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend / B.S. Coller, S.J. Shattil // Blood. – 2008. – Vol. 112, N 8. – P. 3011–3025.

60 Humphries, J.D. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin / J.D. Humphries, P. Wang, C. Streuli, B. Geige, M.J. Humphries, C. Ballestrem // J. Cell. Biol. – 2007. – Vol. 179, N 5. – P. 1043–1057.

61 Puklin-Faucher, E. The mechanical integrin cycle / E. Puklin-Faucher, M.P. Sheetz // J. Cell. Sci. – 2009. – Vol. 122, N Pt2. – P. 179–186

62 Mierke, C.T. The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells / C.T. Mierke // Cell Biochem. Biophys. – 2009. – Vol. 53, N 3. – P. 115–126.

63 Mitsios, J.V. What is vinculin needed for in platelets? / J.V. Mitsios, N. Prevost, A. Kasirer-Friede, E. Gutierrez, A. Groisman, C.S. Abrams, Y. Wang, R.I. Litvinov, A. Zemljic-Harpf, R.S. Ross, S.J. Shattil //J. Thromb. Haemost. – 2010. – Vol. 8, N 10. – P. 2294–2304.

64 Haling, J.R. Talin-dependent integrin activation is required for fibrin clot retraction by platelets / J.R. Haling, S.J. Monkley, D.R. Critchley, B.G. Petrich // Blood 2011. – Vol. 117, N 5. – P. 1719–1722.

65 Moser, M. The tail of integrins, talin, and kindlins / M. Moser, K.R. Legate, R. Zent, R. Fassler // Science – 2009. – Vol. 324, N 5929. – P. 895–899.

66 Malinin, N.L. Kindlins in FERM adhesion / N.L. Malinin, E.F. Plow, T.V. Byzova // Blood – 2010. – Vol. 115, N 20. – P. 4011–4017.

67 Svensson, L. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation / L. Svensson, K. Howarth, A. McDowall, I. Patzak, R. Evans, S. Ussar, M. Moser, A. Metin, M. Fried, I. Tomlinson, N. Hogg // Nat Med – 2009. – Vol. 15, N 3. – P. 306–312.

68 Malinin, N.L. A point mutation in KINDLIN3 ablates activation of three integrin subfamilies in humans / N.L. Malinin, L. Zhang, J. Choi, A. Ciocea, O. Razorenova, Y.Q. Ma, E.A. Podrez, M. Tosi, D.P. Lennon, A.I. Caplan, S.B. Shurin, E.F. Plow, T.V. Byzova // Nat. Med. – 2009. – Vol. 15, N 3. – P. 313–318.

69 Vestweber, D. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands / D. Vestweber, J.E. Blanks // Physiol. Rev. – 1999. – Vol. 79, N 1. – P. 181-213.

70 Hamburger, S.A. GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils / S.A. Hamburger, R.P. McEver // Blood. – 1990. – Vol. 75, N 3. – P. 550–554.

71 Larsen, E. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes / E. Larsen, A. Celi, G.E. Gilbert, B.C. Furie, J.K. Erban, R. Bonfanti, D.D. Wagner, B. Furie // Cell. – 1989. – Vol. 59, N 2. – P. 305-312.

72 Geng, J.G. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140 / J.G. Geng, M.P. Bevilacqua, K.L. Moore, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, J.M. Kim, G.A. Bliss, G.A. Zimmerman, R.P. McEver // Nature. – 1990. – Vol. 343, N 6260. – P. 757-760.

73 Horton, E.R. The integrin adhesome network at a glance / E.R. Horton, J.D. Humphries, J. James, M.C. Jones, J.A. Askari, M.J. Humphries // J. Cell Sci. – 2016. – Vol. 129, N 22. – P. 4159-4163.

74 van der Flier, A. Function and interactions of integrins / A. van der Flier, A. Sonnenberg // Cell Tissue Res. – 2001. – Vol. 305, N 3. – P. 285-298.

75 Grenz, H. Alpha 3 beta 1 integrin is moved into focal contacts in kidney mesangial cells / Grenz H, Carbonetto S, Goodman SL // J. Cell Sci. – 1993. – Vol. 105, N Pt 3. – P. 739-751.

76 Miyamoto, S. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules / S. Miyamoto, H. Teramoto, O.A. Coso, J.S. Gutkind, P.D. Burbelo, S.K. Akiyama, K.M. Yamada // J. Cell Biol. – 1995. – Vol. 131, N 3. – P. 791-805.

77 Liu, S. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins / S. Liu, D.A. Calderwood, M.H. Ginsberg // J. Cell Sci. – 2000. – Vol. 113, N Pt 20. – P. 3563-3571.

78 Burridge, K. Focal adhesions, contractility, and signaling / Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 1996. – Vol. 12. – P. 463-519.

79 Schoenwaelder, S.M. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins / S.M. Schoenwaelder, K. Burridge // Curr. Opin. Cell Biol. – 1999. – Vol. 11, N 2. – P. 274-286.

80 Mueller, S.C. Dynamic cytoskeleton-integrin associations induced by cell binding to immobilized fibronectin / S.C. Mueller, T. Kelly, M.Z. Dai, H.N. Dai, W.T. Chen // J. Cell Biol. – 1989. – Vol. 109, N 6 Pt 2. – P. 3455-3464.

81 Strömblad, S. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis / S. Strömblad, J.C. Becker, M. Yebra, P.C. Brooks, D.A. Cheresh. // J. Clin. Invest. – 1996. – Vol. 98, N 2. – P. 426-433.

82 Kozlova, N.I. Integrin alphaVbeta3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells / N.I. Kozlova, G.E. Morozevich, A.N. Chubukina, A.E. Berman // Oncogene. – 2001. – Vol. 20, N 34. – P. 4710-4717.

83 Zamir, E. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts / E. Zamir, M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K.M. Yamada, B.Z. Katz, S. Lin, D.C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, B. Geiger // Nat. Cell Biol. – 2000. – Vol. 2, N 4. – P. 191-196.

84 Katz, B.Z. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions / B.Z. Katz, E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, B. Geiger // Mol. Biol. Cell. – 2000. – Vol. 11, N 3. – P. 1047-1060.

85 Schwartz, M.A. Signaling networks linking integrins and rho family GTPases / M.A. Schwartz, S.J. Shattil // Trends Biochem. Sci. – 2000. – Vol. 25, N 8. – P. 388-391.

86 Marcantonio, E.E. Mapping of the functional determinants of the integrin beta 1 cytoplasmic domain by site-directed mutagenesis / E.E. Marcantonio, J.L. Guan, J.E. Trevithick, R.O. Hynes // Cell Regul. – 1990. – Vol. 1, N 8. – P. 597-604.

87 O'Toole, T.E. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction / T.E. O'Toole, Y. Katagiri, R.J. Faull, K. Peter, R. Tamura, V. Quaranta, J.C. Loftus, S.J. Shattil, M.H. Ginsberg // J. Cell Biol. – 1994. – Vol. 124, N 6. – P. 1047-1059.

88 Lewis, J.M. Protein kinase C regulates alpha V beta 5-dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation / J.M. Lewis, D.A. Cheresh, M.A. Schwartz // J. Cell Biol. – 1996. – Vol. 134, N 5. – P. 1323-1332.

89 Löster, K. alpha1 Integrin cytoplasmic domain is involved in focal adhesion formation via association with intracellular proteins / K. Löster, D. Vossmeyer, W.

Hofmann, W. Reutter, K. Danker // Biochem. J. – 2001. – Vol. 356, N Pt 1. – P. 233-240.

90 Berman, A.E. Integrins: structure and signaling / A.E. Berman, N.I. Kozlova, G.E. Morozevich // Biochemistry (Mosc). – 2003. – Vol. 68, N 12. – P. 1284-1299.

91 Fox, J.E. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton / J.E. Fox, L. Lipfert, E.A. Clark, C.C. Reynolds, C.D. Austin, J.S. Brugge // J. Biol. Chem. – 1993. – Vol. 268, N 34. – P. 25973-25984.

92 Giancotti, F.G. Integrin signaling / F.G. Giancotti, E. Ruoslahti // Science. – 1999. – Vol. 285, N 5430. – P. 1028-1032.

93 Vuori, K. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions / K. Vuori // J. Membr. Biol. – 1998. – Vol. 165, N 3. – P. 191-199.

94 Bellis, S.L. Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin / S.L. Bellis, J.A. Perrotta, M.S. Curtis, C.E. Turner // Biochem. J. – 1997. – Vol. 325, N Pt 2. – P. 375-381.

95 Howe, A.K. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences / A.K. Howe, A.E. Aplin, R.L. Juliano // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2002. – Vol. 12, N 1. – P. 30-35.

96 Boudreau, N.J. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come / N.J. Boudreau, P.L. Jones // Biochem. J. – 1999. – Vol. 339, N Pt 3. – P. 481-488.

97 Malik, R.K. Integrin-dependent activation of the p70 ribosomal S6 kinase signaling pathway / R.K. Malik, J.T. Parsons // J. Biol. Chem. – 1996. – Vol. 271, N 47. – P. 29785-29791.

98 Sorrentino, S. Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function / S. Sorrentino, J.D. Studt, O. Medalia, K. Tanuj Sapra // Eur. J. Cell Biol. – 2015. – Vol. 94, N 3-4. – P. 129-138.

99 Cerecedo, D. Platelet cytoskeleton and its hemostatic role / D. Cerecedo // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2013. – Vol. 24, N 8. – P. 798-808.

100 Fox, J.E. The platelet cytoskeleton / J.E. Fox // Thromb. Haemost. – 1993. – Vol. 70, N 6. – P. 884–893.

101 Claessens, M.M. Helical twist controls the thickness of F-actin bundles / M.M. Claessens, C. Semmrich, L. Ramos, A.R. Bausch // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol. 105, N 26. – P. 8819–8822.

102 Fox, J.E. Actin filament content and organization in unstimulated platelets / J.E. Fox, J.K. Boyles, C.C. Reynolds, D.R. Phillips // J. Cell Biol. – 1984. – Vol. 98, N 6. – P. 1985–1991.

103 Fox J.E.B. Regulation of platelet function by the cytoskeleton / Mechanisms of Platelet Activation and Control. Edited by K.S. Authi, S.P. Watson, V.V. Kakkar // – 1993. – Vol. 344. – P. 175-185.

104 Pollard, T.D. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments / T.D. Pollard, G.G. Borisy // Cell. – 2003. – Vol. 112, N 4. – P. 453–465.

105 Pellegrin, S. Actin stress fibres / S. Pellegrin, H. Mellor // J. Cell Sci. – 2007. – Vol. 120, N Pt 20. – P. 3491–3499.

106 Escolar, G. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension / G. Escolar, M. Krumwiede, J.G. White // Am. J. Pathol. – 1986. – Vol. 123, N 1. – P. 86–94.

107 Allen, R.D. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy / R.D.

Allen, L.R. Zacharski, S.T. Widirstky, R. Rosenstein, L.M. Zaitlin, D.R. Burgess // J. Cell Biol. – 1979. – Vol. 83, N 1. – P. 126–142.

108 Bearer, E.L. Actin dynamics in platelets / E.L. Bearer, J.M. Prakash, Z. Li // Int. Rev. Cytol. – 2002. – Vol. 217. – P. 137–182.

109 Nobes, C.D. Rho, rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia / C.D. Nobes, A. Hall // Cell. – 1995. – Vol. 81, N 1. – P. 53–62.

110 Akbar, H. Gene targeting implicates Cdc42 GTPase in GPVI and non-GPVI mediated platelet filopodia formation, secretion and aggregation / H. Akbar, X. Shang,
R. Perveen, M. Berryman, K. Funk, J.F. Johnson, N.N. Tandon, Y. Zheng // PLoS One.
2011. – Vol. 6, N 7. – e22117.

111 Hartwig, J.H. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments / J.H. Hartwig, M. DeSisto // J. Cell Biol. – 1991. – Vol. 112, N 3. – P. 407-425.

112 Hartwig, J.H. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation / J.H. Hartwig // J. Cell Biol. – 1992. – Vol. 118, N 6. – P. 1421–1442.

113 Abraham, V.C. The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells / V.C. Abraham, V. Krishnamurthi, D.L. Taylor, F. Lanni // Biophys. J. – 1999. – Vol. 77, N 3. – P. 1721–1732.

114 Borisy, G.G. Actin machinery: pushing the envelope / G.G. Borisy, T.M. Svitkina // Curr. Opin. Cell Biol. – 2000. – Vol. 12, N 1. – P. 104–112.

115 Mullins, R.D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments / R.D. Mullins, J.A. Heuser, T.D. Pollard // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, N 11. – P. 6181–6186.

116 Li, Z. Arp2/3 complex is required for actin polymerization during platelet shape change / Z. Li, E.S. Kim, E.L. Bearer // Blood. – 2002. – Vol. 99, N 12. – P. 4466–4474.

117 Bender, M. ADF/n-cofilin-dependent actin turnover determines platelet formation and sizing. M. Bender, A. Eckly, J.H. Hartwig, M. Elvers, I. Pleines, S. Gupta, G. Krohne, E. Jeanclos, A. Gohla, C. Gurniak, C. Gachet, W. Witke, B. Nieswandt // Blood. – 2010. – Vol. 116, N 10. – P. 1767–1775.

118 Bearer, E.L. Cytoskeletal domains in the activated platelet / E.L. Bearer // Cell Motil. Cytoskeleton. – 1995. – Vol. 30, N 1. – P. 50–66.

119 Calaminus, S.D. Identification of a novel, actin-rich structure, the actin nodule, in the early stages of platelet spreading / S.D. Calaminus, S. Thomas, O.J. McCarty, L.M. Machesky, S.P. Watson // J. Thromb. Haemost. – 2008. – Vol. 6, N 11. – P. 1944–1952.

120 Corum, L.E. Using microcontact printing of fibrinogen to control surfaceinduced platelet adhesion and activation / L.E. Corum, C.D. Eichinger, T.W. Hsiao, V. Hlady // Langmuir. – 2011. – Vol. 27, N 13. – P. 8316–8322.

121 Vogel, V. Local force and geometry sensing regulate cell functions / V. Vogel, M. Sheetz // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2006. – Vol. 7, N 4. – P. 265–275.

122 Miranti, C.K. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction / C.K. Miranti, J.S. Brugge // Nat. Cell Biol. – 2002. – Vol. 4:, N 4. – P. E83–E90.

123 Schwarz Henriques, S. Force field evolution during human blood platelet activation / S. Schwarz Henriques, R. Sandmann, A. Strate, S. Koster // J. Cell Sci. – 2012. – Vol. 125, N Pt 16. – P. 3914–3920.

124 Tanaka, K. Reorganization of stress fiber-like structures in spreading platelets during surface activation / K. Tanaka, K. Itoh // J. Struct. Biol. – 1998. – Vol. 124, N 1. – P. 13–41.

125 Paterson, H.F. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology / H.F. Paterson, A.J. Self, M.D. Garrett, I. Just, K. Aktories, A. Hall // J. Cell Biol. – 1990. – Vol. 111, N 3. – P. 1001–1007.

126 Gao, G. RhoA effector mDia1 is required for PI 3-kinase-dependent actin remodeling and spreading by thrombin in platelets / G. Gao, L. Chen, B. Dong, H. Gu, H. Dong, Y. Pan, Y. Gao, X. Chen // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – Vol. 385, N 3. – P. 439–444.

127 White, J.G. Influence of microtubule stabilization on platelet physiology / J.G. White // Trans. Assoc. Am. Physicians. – 1982. – Vol. 95. – P. 264–271.

128 White, J.G. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape / J.G. White, G.H. Rao // Am. J. Pathol. – 1998. – Vol. 152, N 2. – P. 597–609.

129 White, J.G. The substructure of human platelet microtubules / J.G. White // Blood. – 1968. – Vol. 32, 4. – P. 638–648.

130 Lewis, S.A. Free intermingling of mammalian betatubulin isotypes among functionally distinct microtubules / S.A. Lewis, W. Gu, N.J. Cowan // Cell. – 1987. – Vol. 49, N 4. – P. 539–548.

131 Lecine, P. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2 / P. Lecine, J.E. Italiano Jr, S.W. Kim, J.L. Villeval, R.A. Shivdasani // Blood. – 2000. – Vol. 96, N 4. – P. 1366–1373.

132 Maruthamuthu, V. Conserved F-actin dynamics and force transmission at cell adhesions / V. Maruthamuthu, Y. Aratyn-Schaus, M.L. Gardel // Curr. Opin. Cell Biol. – 2010. – Vol. 22, N 5. – P. 583–588.

133 Glogauer, M. The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection / M. Glogauer, P. Arora, D. Chou, P.A. Janmey, G.P. Downey, C.A. McCulloch // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, N 3. – P. 1689-1698.

134 Calderwood, D.A. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation / D.A. Calderwood, R. Zent, R. Grant, D.J. Rees, R.O. Hynes, M.H.Ginsberg // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 40. – P. 28071-28074.

135 Priddle, H. Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells / H. Priddle, L. Hemmings, S. Monkley, A. Woods, B. Patel, D. Sutton, G.A. Dunn, D. Zicha, D.R. Critchley // J. Cell Biol. – 1998. – Vol. 142, N 4. – P. 1121-1133.

136 Martel, V. Talin controls the exit of the integrin alpha 5 beta 1 from an early compartment of the secretory pathway / V. Martel, L. Vignoud, S. Dupé, P. Frachet, M.R. Block, C. Albigès-Rizo // J. Cell Sci. – 2000. – Vol. 113, N Pt 11. – P. 1951-1961.

137 Berndt, M.C. Platelets, thrombosis and the vessel wall / Edited by M.C. Berndt // Harwood academic publishers. – 2003.

138 Goldmann, W.H. Kinetic determination of focal adhesion protein formation / W.H. Goldmann // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – Vol. 271, N 2. – P. 553-557.

139 Retta, S.F. beta1-integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function / S.F. Retta, F. Balzac, P. Ferraris, A.M. Belkin, R. Fässler, M.J. Humphries, G. De Leo, L. Silengo, G. Tarone // Mol. Biol. Cell. – 1998. – Vol. 9, N 4. – P. 715-731.

140 Loo, D.T. Filamin binds to the cytoplasmic domain of the beta1-integrin. Identification of amino acids responsible for this interaction / D.T. Loo, S.B. Kanner, A. Aruffo // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, N 36. – P. 23304-23312.

141 Dale, G.L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface / G.L. Dale, P. Friese, P. Batar, S.F. Hamilton, G.L. Reed, K.W. Jackson, K.J. Clemetson, L. Alberio // Nature. – 2002. – Vol. 415, N 6868. – P. 175-179.

142 Hartwig, J.H. The elegant platelet: signals controlling actin assembly / J.H. Hartwig, K. Barkalow, A. Azim, J. Italiano // Thromb. Haemost. – 1999. – Vol. 82, N 2. – P. 392–398.

143 Yakimenko, A.O. Identification of different proaggregatory abilities of activated platelet subpopulations / A.O. Yakimenko, F.Y. Verholomova, Y.N. Kotova, F.I. Ataullakhanov, M.A. Panteleev // Biophys. J. – 2012. – Vol. 102, N 10. – P. 2261–2269.

144 Topalov, N.N. Identification of signal transduction pathways involved in the formation of platelet subpopulations upon activation / N.N. Topalov, Y.N. Kotova, S.A. Vasil'ev, M.A. Panteleev // Br. J. Haematol. – 2012. – Vol. 157, N 1. – P. 105-115.

145 Heemskerk, J.W. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses / J.W. Heemskerk, W.M. Vuist, M.A. Feijge, C.P. Reutelingsperger, T. Lindhout // Blood – 1997. – Vol. 90, N 7. – P. 2615–2625.

146 Panteleev, M.A. Two subpopulations of thrombin-activated platelets differ in their binding of the components of the intrinsic factor X-activating complex / M.A. Panteleev, N.M. Ananyeva, N.J. Greco, F.I. Ataullakhanov, E.L. Saenko // J. Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 3, N 11. – P. 2545-2553.

147 Mann, K.G. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes / K.G. Mann, M.E. Nesheim, W.R. Church, P. Haley, S. Krishnaswamy // Blood. – 1990. – Vol. 76, N 1. – P. 1-16.

148 Kuijpers, M.J. Key role of platelet procoagulant activity in tissue factor-and collagen-dependent thrombus formation in arterioles and venules in vivo differential sensitivity to thrombin inhibition / M.J. Kuijpers, I.C. Munnix, J.M. Cosemans, B.V. Vlijmen, C.P. Reutelingsperger, M.O. Egbrink, J.W. Heemskerk // Microcirculation. – 2008. – Vol. 15, N 4. – P. 269-282.

149 Hayashi, T. Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo / T. Hayashi, H. Mogami, Y. Murakami, T. Nakamura, N. Kanayama, H. Konno, T. Urano // Pflugers Arch. – 2008. – Vol. 456, N 6, – P. 1239-1251.

150 Fujii, T. TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets / T. Fujii, A. Sakata, S. Nishimura, K. Eto, S. Nagata // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2015. – Vol. 112, N 41. – P. 12800-12805.

151 Comfurius, P. The involvement of cytoskeleton in the regulation of transbilayer movement of phospholipids in human blood platelets / P. Comfurius, E.M. Bevers, R.F. Zwaal // Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – Vol. 815, N 1. – P. 143-148.

152 Verhallen, P.F. Fluoride-dependent calcium-induced platelet procoagulant activity shows that calpain is involved in increased phospholipid transbilayer movement / P.F. Verhallen, E.M. Bevers, P. Comfurius, R.F. Zwaal // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – Vol. 942, N 1. – P. 150–158.

153 Khorchid, A. How calpain is activated by calcium / A. Khorchid, M. Ikura // Nat. Struct. Biol. – 2002. – Vol. 9, N 4. – P. 239–241.

154 Yan, B. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain / B. Yan, D.A. Calderwood, B. Yaspan, M.H. Ginsberg // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. 276, N 30. – P. 28164-28170.

155 Hayashi, M. The behavior of calpain-generated N- and C-terminal fragments of talin in integrin-mediated signaling pathways / M. Hayashi, H. Suzuki, S. Kawashima, T.C. Saido, M. Inomata // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. – Vol. 371, N 2. – P. 133-141.

156 Hartwig, J.H. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments / J.H. Hartwig, M. DeSisto // J. Cell Biol. – 1991. – Vol. 112, N 3. – P. 407–425.

157 Goldenthal, K.L. Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins / K.L. Goldenthal, K. Hedman, J.W. Chen, J.T. August, M.C. Willingham // J. Histochem. Cytochem. – 1985. – Vol. 33, N 8. – P. 813–820.

158 Kotova, Y.N. Formation of coated platelets is regulated by the dense granule secretion of adenosine 5'diphosphate acting via the P2Y12 receptor / Y.N. Kotova, F.I. Ataullakhanov, M.A. Panteleev // J. Thromb. Haemost. – 2008. – Vol. 6, N 9. – P. 1603-1605.

159 Shevchenko, A. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes / A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, M.Mann // Nat. Protoc. – 2006. – Vol. 1, N 6. – P. 2856–2860.

160 Brooks, M.B. Scott syndrome dogs have impaired coated-platelet formation and calcein-release but normal mitochondrial depolarization / M.B. Brooks, J.L. Catalfamo, P. Friese, G.L. Dale // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 5, N 9. – P. 1972-1974. 161 Dachary-Prigent, J. Annexin V as a probe of aminophospholipid exposure and platelet membrane vesiculation: a flow cytometry study showing a role for free sulfhydryl groups / J. Dachary-Prigent, J.M. Freyssinet, J.M. Pasquet, J.C. Carron, A.T. Nurden // Blood. – 1993. – Vol. 81, N 10. – P. 2554–2565.

162 Briedé, J.J. Heterogeneity in microparticle formation and exposure of anionic phospholipids at the plasma membrane of single adherent platelets / J.J. Briedé, J.W. Heemskerk, H.C. Hemker, T. Lindhout // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1451, N 1. – P. 163-172.

163 Abaeva, A.A. Procoagulant platelets form an α-granule protein-covered 'cap' on their surface that promotes their attachment to aggregates / A.A. Abaeva, M. Canault, Y.N. Kotova, S.I. Obydennyy, A.O. Yakimenko, N.A. Podoplelova, V.N. Kolyadko, H. Chambost, A.V. Mazurov, F.I. Ataullakhanov, A.T. Nurden, M.C. Alessi, M.A. Panteleev // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, N 41. – P. 29621–29632.

164 Hess, M.W. Procoagulant platelet balloons: evidence from cryopreparation and electron microscopy / M.W. Hess, P. Siljander // Histochem. Cell Biol. – 2001. – Vol. 115, N 5. – P. 439–443.

165 Palabrica, T. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets / T. Palabrica, R. Lobb, B.C. Furie, M. Aronovitz, C. Benjamin, Y.M. Hsu, S.A. Sajer, B. Furie // Nature – 1992. – Vol. 359, N 6398. – P. 848–851.

166 Schoenwaelder, S.M. Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin alphaIIbbeta3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots / S.M. Schoenwaelder, Y. Yuan, P. Cooray, H.H. Salem, S.P. Jackson // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, N 3. – P. 1694–1702.

167 Azam, M. Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function / M. Azam, S.S. Andrabi, K.E. Sahr, L. Kamath, A. Kuliopulos, A.H. Chishti // Mol. Cell. Biol. – 2001. – Vol. 21, 6. – P. 2213–2220.

168 Pasquet, J.M. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets / J.M. Pasquet, J. Dachary-Prigent, A.T. Nurden // Eur. J. Biochem. – 1996. – Vol. 239, N 3. – P. 647–654.

169 Shcherbina, A. Role of caspase in a subset of human platelet activation responses / A. Shcherbina, E. Remold-O'Donnell // Blood. – 1999. – Vol. 93, N 12. – P. 4222–4231.

170 Siljander, P. Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response: involvement of p38 MAP kinase and calpain / P.Siljander, R.W. Farndale, M.A. Feijge, P. Comfurius, S. Kos, E.M. Bevers, J.W. Heemskerk // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2001. – Vol. 21, N 4. – P. 618–627.

171 Wang, K.K. Calpain and caspase: can you tell the difference? / K.K. Wang // Trends Neurosci. – 2000. – Vol. 23, N 1. – P. 20–26.

172 Jackson, S.P. Procoagulant platelets: are they necrotic? / S.P. Jackson, S.M. Schoenwaelder // Blood. – 2010. – Vol. 116, N 12. – P. 2011–2018.

173 van Kruchten, R. Both TMEM16F-dependent and TMEM16F-independent pathways contribute to phosphatidylserine exposure in platelet apoptosis and platelet activation / R. van Kruchten, N.J. Mattheij, C. Saunders, M.A. Feijge, F. Swieringa, J.L. Wolfs, P.W. Collins, J.W. Heemskerk, E.M. Bevers // Blood. – 2013. – Vol. 121, N 10. – P. 1850–1857.

174 Dale, G.L. Quantitation of microparticles released from coated-platelets / G.L. Dale, G. Remenyi, P. Friese // J. Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 3, N 9. – P. 2081–2088.

175 Yano, Y. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist induced microparticle formation from the platelet plasma membrane / Y. Yano, E. Shiba, J. Kambayashi, M. Sakon, T. Kawasaki, K. Fujitani, J. Kang, T. Mori // Thromb. Res. – 1993. – Vol. 71, N 5. – P. 385–396.

176 Agbani, E.O. Coordinated membrane ballooning and procoagulant spreading in human platelets / E.O. Agbani, M.T. van den Bosch, E. Brown, C.M. Williams, N.J. Mattheij, J.M. Cosemans, P.W. Collins, J.W. Heemskerk, I. Hers, A.W. Poole // Circulation – 2015. – Vol. 132, N 15. – P. 1414–1424.

177 Gaffet, P. Phosphatidylserine exposure on the platelet plasma membrane during A23187-induced activation is independent of cytoskeleton reorganization / P. Gaffet, N. Bettache, A. Bienvenue // Eur. J. Cell Biol. – 1995. – Vol. 67, N 4. – P. 336–345.

178 Liu, F. Mitochondrially mediated integrin αIIb β 3 protein inactivation limits thrombus growth / F. Liu, G. Gamez, D.R. Myers, W. Clemmons, W.A. Lam, S.M. Jobe // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, N 42. – P. 30672–30681.

179 Mattheij, N.J. Dual mechanism of integrin αIIbβ3 closure in procoagulant platelets / N.J. Mattheij, K. Gilio, R. van Kruchten, S.M. Jobe, A.J. Wieschhaus, A.H. Chishti, P. Collins, J.W. Heemskerk, J.M. Cosemans // J. Biol. Chem. – 2013. – Vol. 288, N 19. – P. 13325–13336.

180 Cranmer, S.L. High shear-dependent loss of membrane integrity and defective platelet adhesion following disruption of the GPIb α -filamin interaction / S.L. Cranmer, K.J. Ashworth, Y. Yao, M.C. Berndt, Z.M. Ruggeri, R.K. Andrews, S.P. Jackson // Blood. – 2011. – Vol. 117, N 9. – P. 2718–2727.

181 Perrault, C. Role of the intracellular domains of GPIb in controlling the adhesive properties of the platelet GPIb/V/IX complex / C. Perrault, P. Mangin, M.

Santer, M.J. Baas, S. Moog, S.L. Cranmer, I. Pikovski, D. Williamson, S.P. Jackson, J.P. Cazenave, F. Lanza // Blood. – 2003. – Vol. 101, N 9. – P. 3477–3484.

182 Pasquet, J.M. Microvesicle release is associated with extensive protein tyrosine dephosphorylation in platelets stimulated by A23187 or a mixture of thrombin and collagen / J.M. Pasquet, J. Dachary-Prigent, A.T. Nurden // Biochem. J. – 1998. – Vol. 333, N Pt 3. – P. 591–599.

183 Kulkarni, S. Platelet factor XIII and calpain negatively regulate integrin alphaIIbbeta3 adhesive function and thrombus growth / S. Kulkarni, S.P. Jackson // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N 29. – P. 30697–30706.

Благодарности

Выражаю огромную благодарность моему научному руководителю доктору физико-математических наук, профессору Михаилу Александровичу Пантелееву за постоянное внимание и помощь при выполнении данной работы.

Благодарю директора ЦТП ФХФ РАН Фазоила Иноятовича Атауллаханова за возможность на протяжении нескольких лет заниматься данной темой.

Исренне благодарю бывшего научного сотрудника ЦТП ФХФ РАН Алену Олеговну Якименко за помощь при получении и обработке конфокальных изображений. Также благодарю сотрудника ФГБУ ГНЦ Института иммунологии Алексея Васильевича Пичугина за сортировку клеток и сотрудника ИБХ РАН Рустама Хусмановича Зиганшина за масс-спектрометрию.