

УДК 612.111/115.3

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

А. В. БАКУНОВИЧ¹⁾, К. Я. БУЛАНОВА¹⁾, Л. М. ЛОБАНОК²⁾

¹⁾*Белорусский государственный университет,
Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, Минск, Беларусь*

²⁾*Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220116, Минск, Беларусь*

Рассматриваются процессы активации тромбоцитов, вызванные действием различных агонистов, воздействующих на ряд структурно-функциональных молекул мембранной поверхности, а также на специфические рецепторы, активирующие различные сигнальные пути. Одни из них обеспечивают поддержание гемостаза при нарушениях целостности сосудов, другие – запускают синтез биологически активных молекул. Большое внимание уделяется молекулярным механизмам гемостатической реакции: процессам узнавания тромбоцитами поврежденной стенки кровеносного сосуда, прилипания к эндотелию, последующей их активации и агрегации; роли гликопротеинового комплекса, коллагена в адгезии и агрегации тромбоцитов; главенствующему участию важнейших сигнальных путей и ведущей роли вторичных мессенджеров в активации-дезактивации тромбоцитов. Представлены также данные о различных ферментативных процессах в тромбоцитах, определяющих синтез разных видов эйкозаноидов.

Образец цитирования:

Бакунович А. В., Буланова К. Я., Лобанок Л. М. Молекулярные механизмы агрегации тромбоцитов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2017. № 4. С. 40–51.

For citation:

Bakunovich A. V., Bulanovaa K. Y., Lobanok L. M. Molecular mechanisms of platelet aggregation. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2017. No. 4. P. 40–51 (in Russ.).

Авторы:

Андрей Валерьевич Бакунович – старший преподаватель кафедры экологической химии и биохимии.

Клавдия Яковлевна Буланова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры экологической химии и биохимии.

Леонид Михайлович Лобанок – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси.

Authors:

Andrei V. Bakunovich, senior lecturer of the department of environmental chemistry and biochemistry.

andy.bakunovich@gmail.com

Klavdiya Y. Bulanovaa, PhD (biology), associate professor; associate professor of the department of environmental chemistry and biochemistry.

bulanova_home@tut.by

Leonid M. Lobanok, doctor of sciences (medicine), professor, corresponding member of National Academy of Sciences of Belarus.

normfiz@bsmu.by

Ключевые слова: тромбоциты; адгезия и агрегация тромбоцитов; ионы кальция; пуринорецепторы; активация тромбоцитов; цАМФ; цГМФ; гликопротеиновый комплекс.

MOLECULAR MECHANISMS OF PLATELET AGGREGATION

A. V. BAKUNOVICH^a, K. Y. BULANOVA^a, L. M. LOBANOK^b

^aBelarusian State University, International Sakharov Environmental Institute,
Dolgobrodskaya street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

^bBelarusian State Medical University, Dzerzhinskogo avenue, 83, 220116, Minsk, Belarus

Corresponding author: andy.bakunovich@gmail.com

The article deals with the processes occurring in platelets during their activation caused by a multitude of agonists affecting a number of structural and functional molecules of the membrane surface, as well as specific receptors that activate different signaling pathways. Some of them ensure the maintenance of hemostasis in case of vascular integrity disorders, others - trigger the synthesis of biologically active molecules. Accordingly, most attention is paid to the molecular mechanisms of the haemostatic reaction: the processes of platelet recognition of the damaged wall of the blood vessel, adhesion to the endothelium, their subsequent activation and aggregation; role of glycoprotein complex, collagen in adhesion and platelet aggregation; the predominant participation of the most important signaling pathways and the leading role of secondary messengers in activation-deactivation of platelets. The article also presents data of various enzymatic processes in platelets that determine the synthesis of different types of eicosanoids.

Key words: platelets; platelet adhesion and aggregation; calcium ions; purinoreceptors; platelet activation; cAMP; cGMP; glycoprotein complex.

Введение

Кровь является жизненно важной транспортной системой человеческого организма, которая переносит кислород и питательные вещества для поддержания жизнедеятельности клеток и одновременно обеспечивает удаление диоксида углерода и других продуктов жизнедеятельности из организма. В случае повреждения кровеносного сосуда запускается механизм гемостаза, инициирующий быстрые пути реагирования, направленные на остановку кровотечения. Так, кровь, поддерживаемая в жидком состоянии во время ее движения по системе сосудов, в случае повреждения всегда готова быстро сформировать гемостатическую пробку для предотвращения нежелательного кровотечения.

Поскольку кровь постоянно находится в движении, гемостатические механизмы должны действовать чрезвычайно быстро и эффективно. При этом требуется наличие регуляторных механизмов, сохраняющих идеальное равновесие и не позволяющих спонтанной активизации гемостатических реакций. Если гемостатическая система слишком эффективна или ее механизмы контроля выходят из строя, это может привести к нежелательным тромбообразованиям с последующей закупоркой кровеносных сосудов или эмболии.

Тромбоциты играют ведущую роль в нарушении реологических свойств крови и запуске гемостатической реакции. При нормальных условиях циркулирующие в кровяном русле тромбоциты практически не взаимодействуют друг с другом и другими клетками. Исключением является лишь взаимодействие с эндотелием сосудов в процессе ангиотрофической функции. Однако при повреждении кровеносного сосуда кровяные пластинки подвергаются действию различных соединений, инициирующих процессы адгезии и агрегации, в результате чего образуется тромбоцитарная пробка. Следует отметить, что движущая сила крови приводит к концентрированию эритроцитов и других крупных клеток крови в центре потока, а тромбоцитов – ближе к стенке сосуда, где скорость движения жидкости ниже поскольку градиент скорости всегда находится ближе к стенке сосуда [1]. Такое распределение имеет особенную значимость в случае повреждения кровеносного сосуда: кровяные пластинки немедленно подвергаются действию различных соединений из разрушенных клеток, которые инициируют процессы узнавания сосудистых повреждений, адгезии и агрегации тромбоцитов, приводящих к образованию тромбоцитарной пробки. Гемостатическая реакция включает несколько стадий: узнавание тромбоцитом поврежденной стенки кровеносного сосуда, прилипание к эндотелию, его активацию и последующую агрегацию.

Узнавание поврежденной стенки сосуда. Адгезия. Первой стадией свертывания крови является прилипание тромбоцитов к субэндотелиальному матриксу или активированному эндотелию в результате

травмы сосуда при острой гипертензии или вследствие действия свободных радикалов, продуктов курения, бактериальных токсинов, вирусной инфекции, цитокинов (TNF, IL-1 и др.), иммунных комплексов и др. [2]. Процесс опосредуется синергической функцией нескольких рецепторов на поверхности плазматической мембраны тромбоцитов и наличия адгезивных молекул в околоклеточном пространстве, которые высвобождаются из эндотелиальных клеток в кровь и экстраклеточный матрикс.

Роль гликопротеинового комплекса в адгезии тромбоцитов. При скоплении кровяных пластинок возле стенки сосуда, прикреплению их к коллагену способствует гликопротеиновый Ib-IX-V (GPIb-IX-V) комплекс рецепторов. Комплекс GPIb-IX-V находится на поверхности плазматической мембраны тромбоцитов и состоит из 4 субъединиц: GPIb α , GPIb β , GPIX и GPV [3], относится к семейству белков, богатых лейцином, и является мембранным рецептором для фактора фон Виллебранда (von Willebrand factor; vWF), выделяющегося из альфа-гранул тромбоцитов и эндотелиальных клеток в кровяное русло [4]. vWF способствует адгезии тромбоцитов к коллагену, обеспечивая их прикрепление к месту повреждения сосуда. Данная связь является достаточно слабой, однако приводит к замедлению движения тромбоцитов, давая возможность взаимодействовать другим рецепторам тромбоцитов с коллагеном. Мультимеры фактора фон Виллебранда содержат несколько сайтов связывания для адгезивных GPIb-IX-V рецепторов, которые в процессе связывания способны передавать сигнал внутрь клетки, приводя к ее активации и перестройке актинового цитоскелета. Кроме того, комплекс GPIb-IX-V также способен связывать альфа-тромбин, факторы свертывания тромбина, факторы XI и XII, P-селектин и Mac-1 [5], стимулировать активацию тромбоцитов. Отсутствие функциональных GPIb-IX-V комплексов на поверхности тромбоцитов является причиной синдрома Бернара–Сулье – редкого наследственного заболевания кровотечения, связанного с макротромбоцитопенией.

Роль коллагена в иммобилизации и агрегации тромбоцитов. Дальнейшим этапом активации является накопление и закрепление тромбоцитов на поврежденной поверхности. Данный процесс происходит за счет различных рецепторов на поверхности плазматической мембраны и наличия адгезивных молекул в околоклеточном пространстве. В месте повреждения обычно присутствует избыток коллагена, являющегося основным компонентом матрицы субэндотелия. Таким образом, в действие в первую очередь вступают такие коллагеновые рецепторы, как GPIa/IIa (интегрин $\alpha 2/\beta 1$) и GPVI. Взаимодействие коллагена с GPIa/IIa приводит к расплыванию тромбоцита по поверхности, полной остановке и закреплению на участке повреждения. GPVI-рецептор усиливает закрепление тромбоцита на поврежденной поверхности и приводит к его полной активации и, следовательно, последующей агрегации, инициируя ряд регуляторных механизмов. GPVI способен связываться с Fc рецептором (FcR γ -chain), содержащим ITAM домен (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), предназначенный для трансмембранной передачи сигнала, а взаимодействие с Src (sarcoma) тирозинкиназами Fyn и Lyn, выступающими в роли каталитических субъединиц, приводит к фосфорилированию ITAM и активации тирозинкиназы Syk (Spleen tyrosine kinase) [6]. Активация Syk запускает ряд следующих друг за другом реакций, приводящих к активации фосфолипазы C $\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI $_3$ K) и малых G белков [7], что в итоге приводит к мобилизации ионов кальция из внутриклеточных депо, секреции гранул и агрегации тромбоцитов [6]. Таким образом, GPIa/IIa и GPVI рецепторы необходимы для адгезии и агрегации тромбоцитов на коллагене в условиях движения крови по кровяному руслу, а блокада какого-либо из них отменит возможность формирования тромба.

В норме формирование тромбоцитарной пробки способствует остановке кровотечения и ограничивает потерю крови, однако при патологических состояниях, таких как разрыв атеросклеротических бляшек, взаимодействие тромбоцитов и коллагена могут стать причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний.

Участие гликопротеинового комплекса в дальнейшей стимуляции агрегации. После того, как первичный слой тромбоцитов закрепился на поврежденной поверхности сосуда, адгезия кровяных пластинок сменяется на агрегацию, тогда тромбоциты, двигающиеся по току крови, связываются с адгезивными тромбоцитами в участке повреждения. Однако для того, чтобы новые тромбоциты продолжали агрегировать, уже закрепившиеся клетки должны стимулировать вновь прибывшие. Это распространение активации выполняется с помощью мощных ауто- и паракринных сигнальных путей. Так, последующий механизм агрегации тромбоцитов в первую очередь связан с гликопротеиновым комплексом GPIIb/IIIa (интегрин $\alpha IIb\beta 3$). Гликопротеин IIb/IIIa – Ca $^{2+}$ –зависимый гетеродимер, который обильно распространен на плазматической мембране тромбоцитов, являясь рецептором для фибриногена и фактора фон Виллебранда [8]. Два соседних тромбоцита связываются между собой при помощи двух GPIIb/IIIa рецепторов и одной молекулы фибриногена. В состоянии покоя интегрин $\alpha IIb\beta 3$ обладает низким сродством к фибриногену, однако при активации тромбоцитов это сродство повышается и создается возможность передачи сигнала внутрь клетки. Пациенты с тромбастенией Гланцмана наследуют отсутствие или недо-

статок GPIIb/IIIa рецепторов, а их тромбоциты не связываются фибриногеном и не способны образовывать агрегаты [9].

Роль мембранных рецепторов в агрегации тромбоцитов. Помимо выше приведенных путей, в активации тромбоцитов и последующей их агрегации участвуют ряд биологически-активных соединений (индукторов), находящихся в околкеклеточном пространстве и секретируемых из внутриклеточных депо, а механизм их действия основан на стимулировании специфических рецепторов на клеточной поверхности. Так, в результате секреции из внутренних депо из тромбоцитов выделяются ADP, ATP, Ar_4A , тромбоксан A_2 , серотонин, фактор активации тромбоцитов (platelet-activating factor; PAF), вазопрессин, адреналин и др.

Тромбоксан A_2 и серотонин, посредством 5-HT_{2A}-рецепторов [10], обладают вазоконстрикторными функциями и способствуют скоплению тромбоцитов в месте повреждения.

Фактор активации тромбоцитов, образующийся в результате активации PLA₂, индуцирует клеточную активацию путем связывания с рецептором, сопряженным с G-белком [11], вызывая доза-зависимую агрегацию. Кроме того, PAF стимулирует секрецию из плотных гранул и α -гранул, стимулирует активность GTPазы в клеточных мембранах тромбоцитов человека, а также оборот полифосфоинозитидов, увеличивая внутриклеточный уровень свободного кальция. Предполагается, что PAF не работает через сигнальные пути, транслирующие эффекты ADP, эпинефрина и коллагена, а его способность вызывать вторую волну агрегации и секрецию реализуется, главным образом, с помощью циклооксигеназного пути.

Рецепторы T_xA_2 . T_xA_2 функционирует в качестве посредника, действуя по принципу положительной обратной связи во время активации тромбоцитов. Доза-зависимо стимулирует агрегацию тромбоцитов, способствуя секреции внутриклеточных веществ и увеличению концентрации внутриклеточного кальция [12]. Биологическое действие T_xA_2 осуществляется через его специфический рецептор (TR), присутствующий на поверхности клеток. Тромбоксан A_2 является достаточно слабым индуктором агрегации тромбоцитов, причем считается еще более слабым по сравнению с ADP [6], а его действие локально ограничено из-за короткого периода полураспада и гидролиза до тромбоксана B_2 .

Рецептор тромбоксана A_2 содержит семь трансмембранных доменов, сопряженных с G-белком, а его функциональное исследование показало, что этот рецептор связан с инозитолтрифосфат/ Ca^{2+} передачей сигнала [13]. TR также активируется PGG₂ и PGH₂, соединен с G_q и G₁₂/G₁₃ белками. Воздействуя на TR-рецептор, агонисты, вызывают активацию G_q-белка и его последующую диссоциацию на α - и β - γ -субъединицы.

β - γ -комплекс связан с активацией фосфолипазы C _{β} , активацией фосфоинозитидной системы вторичных посредников и генерацией диацилглицерина (DAG). Так, фосфолипаза C гидролизует фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата (IP₃), который, в свою очередь, вызывает повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция за счет связывания с IP₃ рецептором (IP₃R), являющегося кальций-селективным катионным каналом депонирующей трубчатой системы [14].

DAG вызывает активацию протеинкиназы C (PKC) и секрецию тромбоцитов [15]. Регуляторная роль активированной протеинкиназы C заключается в снижении концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме клетки за счет фосфорилирования и последующего ингибирования активности рецептор-управляемых кальциевых каналов плазматической мембраны.

Таким образом, было показано, что активация TR-рецепторов тромбоцитов обусловлена связыванием с G _{α_{12}} и G _{α_{13}} , вызывая замену GDP на GTP в нуклеотид-связывающем центре. Передача сигнала через G _{α_{13}} , приводит к стимуляции Rho/Rho киназы и последующему фосфорилированию легких цепей миозина тромбоцитов, что приводит к изменениям в формировании актина и перегруппировке цитоскелета тромбоцитов [16]. Эти данные свидетельствуют, что изменения формы тромбоцитов не могут однозначно определяться эффектами G_q-сигнализации, тем более, что ADP не способен вызывать изменения формы в тромбоцитах G_q-дефицитных мышей [17]. А в связи с отсутствием информации, подтверждающей прямое связывание ADP-рецепторов тромбоцитов с G_{12/13}, можно полагать, что изменения формы тромбоцитов может быть вызвано несколькими путями. Предполагается, что в состоянии покоя, в присутствии интактного G_q и G_{12/13}, TR-опосредованные изменения формы тромбоцитов могут на самом деле представлять собой результат реализации композита сигналов через оба пути [18].

И, наконец, TR-опосредованная сигнализация стимулирует активацию системы кальций/кальмодулин, а также ряда низлежащих киназ, Ras, Rho, Rac [19].

Циклооксигеназа-1 (COX-1) и циклооксигеназа-2 (COX-2) экспрессируются в плотной трубчатой системе (DTS) тромбоцитов человека. Однако только молодые тромбоциты способны экспрессировать COX-2 из родительских мегакариоцитов, а зрелые тромбоциты человека в норме экспрессируют только COX-1 [20]. Таким образом, COX-2 физиологически присутствует только в небольшой фракции цирку-

лирующих тромбоцитов, но их образование существенно увеличивается в условиях высокой регенерации тромбоцитов. COX является гем-содержащим бифункциональным белком, который последовательно катализирует две реакции: образование из арахидоновой кислоты простагландина G_2 (PGG_2) и последующее восстановление PGG_2 до простагландина H_2 (PGH_2) [21], которые, в свою очередь, способны по механизму отрицательной обратной связи ингибировать активность циклооксигеназы. Дальнейший метаболизм PGH_2 при помощи различных PG-синтетаз приводит к образованию PGD_2 , PGE_2 , $PGF_2\alpha$, PGI_2 (простациклина) и TxA_2 (тромбоксана A_2) с участием тромбоксан-синтетазы.

Образованный простациклин является вазодилататором и ингибитором агрегации тромбоцитов, тогда как тромбоксан A_2 выполняет противоположную функцию, являясь вазоконстриктором и промотором агрегации, поскольку дополнительно мобилизует кальций из внутриклеточных хранилищ.

Так, основной функцией COX-1 является образование TxA_2 , а функцией COX-2 – производство PGE_2 . В связи с тем, что TxA_2 и PGI_2 выполняют противоположные роли, то дисбаланс их синтеза вовлечен в патофизиологию многих тромбоцитарных и сердечно-сосудистых осложнений. Кроме того, PLA_2 генерирует предшественника фактора активации тромбоцитов, давая возможность ацетилтрансферазе образовать PAF.

PAR-рецепторы (Protease-Activated Receptors) для тромбина. Тромбин является одним из основных активаторов тромбоцитов и главным ферментом системы свертывания крови, который катализирует реакцию превращения фибриногена в фибрин, а также действует на тромбоциты за счет необратимого связывания с мембранными PAR-рецепторами [6]. Образование тромбина инициируется воздействием тканевого фактора с факторами свертывания в плазме после нарушения сосудистого эндотелия и происходит на клеточных поверхностях, включая активированные тромбоциты.

На поверхности тромбоцитов человека присутствуют 2 типа PAR-рецепторов: PAR1 и PAR4 [22]. Исследования с использованием антагонистов этих рецепторов показали, что PAR1 опосредует активацию тромбоцитов человека при низких концентрациях тромбина, в то время как PAR4 способствует тромбин-индуцированной активации тромбоцитов только при его высоких концентрациях [22], указывая на то, что PAR1 обладает большим сродством к тромбину, чем PAR4. Активация PAR1 наблюдается при концентрациях тромбина порядка 50–200 пМ, а число молекул рецептора на поверхности одной клетки составляет около 2000 [6]. Однако PAR4 также активируется низкими концентрациями тромбина и вносит свой вклад в активацию тромбоцитов главным образом в условиях ингибирования или десенситизации PAR1 [6]. PAR1 способствует резкому увеличению концентрации внутриклеточного кальция и очень быстро десенситизируется при больших концентрациях тромбина, в то время как PAR4 характеризуется более продолжительным ответом и может поддерживать этот эффект при больших концентрациях тромбина [23].

Передача сигнала внутрь клетки посредством PAR осуществляется за счет G-белков (G_q , $G_{12/13}$, G_i) [6]. Так, воздействие на G_q белок приводит к активации фосфолипазы C_β (PLC_β) и дальнейшему расщеплению мембранных фосфоинозитидов, образованию DAG и IP_3 . Передача сигналов с PAR-рецепторов на $G_{12/13}$ -белок активирует RhoA (GTPases Ras homolog gene family, member A) и Rho-киназы. Rho-киназа стимулирует фосфорилирование легких цепей миозина, а RhoA участвует в секреции гранул [24]. Воздействие на G_i -белок, приводит к ингибированию аденилатциклазы и тем самым снижению уровня cAMP в тромбоцитах. Кроме того, тромбин способствует секреции ADP.

Пуринорецепторы. Обильно секретируемые из плотных гранул активированных тромбоцитов ADP и АТР, являются лигандами P2 пуринорецепторов, расположенных на поверхности клеток. Пуринорецепторы типа $P2Y_1$ и $P2Y_{12}$ являются G-белок-связывающими рецепторами ($G_{P(q)}$ - и G_i -белками). Один из них ($P2Y_1$) связан с активацией фосфолипазы C и фосфоинозитольным обменом, а другой ($P2Y_{12}$) – с ингибированием аденилатциклазы [25]. Причем для нормальной активации, оба типа этих рецепторов необходимы клетке. Третий тип рецепторов, обозначенный, как $P2X_1$, активируется при помощи АТР и представляет собой Ca^{2+} -канал [26].

$P2Y_1$ рецепторы. Являясь рецептором для ADP [27], $P2Y_1$, при помощи G_q -белка активирует PLC_β , инициируя изменение формы и агрегацию тромбоцитов за счет мобилизации внутриклеточных запасов ионов кальция. Также $P2Y_1$ -рецепторы связаны с Ca^{2+} мобилизацией через Rho/Rho-киназы и, скорее всего соединены с $G_{12/13}$ -белками. По другим данным, G_i и G_q белки активируют SFK (Src family kinase) Лун-киназу, которая запускает каскад биохимических реакций, ведущих к секреции α -гранул и синтезу TxA_2 . SFK активирует PI_3K и Akt-киназу, которая активирует NO-синтазу [6]. Далее активируются cGMP-зависимая протеинкиназа (PKG), ведущая к ингибированию тромбоцитов и секреции α -гранул. А затем активируются MAPKs (mitogen-activated protein kinases), которые в свою очередь тоже приводят к секреции альфа-гранул, а также к синтезу тромбоксана A_2 [28].

Следует отметить, что тромбоциты мышей с дефицитом рецептора P_2Y_1 подвергаются частичной агрегации высокими концентрациями ADP [29]. Это указывает на наличие либо дополнительного (четвертого)

пуринорецептора на поверхности тромбоцитов, либо об определенной связи $P2Y_1$ с другими G-белками, способствующими этому процессу. Таким образом, этот рецептор играет ключевую роль в изменении формы тромбоцитов, а также в инициации ответа тромбоцитов на ADP. Он опосредует первую, обратимую фазу агрегации тромбоцитов, в то время как усиление агрегации и повышение секреции тромбоцитов вызывается другим рецептором для ADP – $P2Y_{12}$ в сочетании с ингибированием аденилатциклазы.

$P2Y_{12}$ рецепторы. $P2Y_{12}$ также является рецептором для ADP [27], ингибирует аденилатциклазу посредством G_i -белков, приводя к снижению уровня cAMP в клетке [6], что имеет важное значение для полного ответа на ADP-индуцированную агрегацию и стабилизацию агрегатов [27], а также усилению ответа тромбоцитов на другие агрегирующие агенты, в том числе тромбоксан A_2 , тромбин и коллаген. Ингибирующее влияние ADP на синтез cAMP в тромбоцитах осуществляется по следующему механизму: активация рецепторов этого типа приводит к их сопряжению с G_i -белками, замене в нуклеотид-связывающем центре α_1 -субъединицы GDP на GTP, что стимулирует ее высвобождение из гетеротримера и соединение с каталитической субъединицей – аденилатциклазой. Димерный β - γ -комплекс также способен играть важную роль в трансдукции сигнала через плазматическую мембрану клетки, но он вызывает эффекты, противоположные α -белку.

Стимуляция $P2Y_{12}$ также имеет важное значение для полной активации гликопротеина Пб-Ша и интегрин $\alpha IIb\beta 3$ [30] при помощи ADP и стабилизации тромбоцитарных агрегатов. Кроме того, ADP-индуцированная генерация тромбоксана A_2 также способствует реакции высвобождения из внутри-тромбоцитарных гранул. $P2Y_{12}$ -зависимая активация тромбоцитов участвует в адгезии тромбоцитов к фибриногену, а также в коллаген-индуцированном формировании тромба [30]. Выявлено, что тромбоциты мышей с дефицитом $P2Y_{12}$ рецепторов не агрегируют при воздействии на них ADP и обладают пониженной чувствительностью к тромбину и коллагену [31], что позволяет убедиться в необходимости активации этого рецептора для стимуляции ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Эксперименты с селективным антагонистом $P2Y_{12}$ рецептора AR-C 66096 показали, что воздействие ADP на этот рецептор не приводит к изменению формы тромбоцита [32]. Активация рецептора $P2Y_{12}$ потенцирует $P2Y_1$ опосредованную рецептором Ca^{2+} сигнализацию. Таким образом, для ADP-зависимой агрегации тромбоцитов необходимы как $P2Y_{12}$, так и $P2Y_1$ -рецепторы [30]. Инициация агрегации осуществляется рецептором $P2Y_1$, тогда как рецептор $P2Y_{12}$ усиливает сигнал активации [27], играя решающую роль в активации циркулирующих тромбоцитов и их скоплению на месте повреждения, а также в повышении активации тромбоцитов вызванной другими агонистами.

$P2X_1$ рецепторы. Третьим P_2 пуринорецептором на поверхности тромбоцитов, является $P2X_1$. Хотя деполяризация и увеличение цитозольного Na^+ вносят свой вклад в сигнализацию, однако все функциональные события на сегодняшний день после активации $P2X_1$ рецепторов зависят от притока ионов кальция [33]. Ca^{2+} активирует увеличение кальмодулин-зависимой киназы легкой цепи миозина, что приводит к фосфорилированию легкой цепи миозина создавая условия для изменения формы и секреции гранул [34]. $P2X_1$ не стимулирует изменение формы через Rho-киназы [34], а избирательное включение $P2X_1$ при помощи РКС вызывает кратковременное фосфорилирование ERK₂, что способствует полной секреции плотных гранул [35] и активации низкого уровня $\alpha IIb\beta 3$ интегрин [36], приводя к слабой, транзитной агрегации. $P2X_1$ -зависимая активация $\alpha IIb\beta 3$, предположительно, осуществляется за счет Ca^{2+} и диацилглицерол-управляемого гуанин-нуклеотид фактора обмена I (CalDAG-GEFI) [37], являющегося внутриклеточной сигнальной молекулой, участвующей в активации малых GTPаз семейства Ras. Он содержит сайты связывания Ca^{2+} , диацилглицерола и гуанин- нуклеотид-фактора обмена (GEF), ответственного за катализ активации Rap1 и Rap2.

Активация $P2X_1$ рецептора стимулирует быстрое и обратимое изменение формы тромбоцита, достигая максимума в течение нескольких секунд, и возвращается в состояние покоя после $\approx 1-2$ мин [33], быстрой и обратимой централизации его секреторных гранул. Кроме того, $P2X_1$ рецептор вызывает деполяризацию мембраны, тем самым усиливая сигнал через $P2Y_1$ и другие G_q -связанные рецепторы.

Для усиления сигналов и функциональных событий в тромбоцитах, $P2X_1$ -рецепторы могут взаимодействовать с несколькими другими рецепторами, особенно при условии низкой концентрации агониста. В частности, активация $P2X_1$ рецепторов с помощью АТР усиливает реакцию агрегации с низким уровнем таких основных агонистов, как коллаген и тромбин [36]. А поскольку АТР и ADP секретируются из плотных гранул, то, более уместно рассмотреть последствия совместной стимуляции $P2X_1$ и $P2Y$ -рецепторов. Таким образом, интересно отметить, что совместное добавление $\alpha\beta$ -meATP и очищенного ADP ускоряют и усиливают Ca^{2+} -ответ, по сравнению с ожидаемой суммой индивидуальных ответов [38]. Таким образом, синергия между $P2X_1$ и $P2Y_1$ может увеличить шансы на образования тромба. Однако другой эксперимент [39] показал, что избирательная коактивация $P2X_1$ рецептора и либо $P2Y_{12}$, либо $P2Y_1$ рецепторов не вызывает агрегацию тромбоцитов, хотя рецептор $P2X_1$ потенцирует $P2Y_1$ рецептор-опосредованное

увеличение внутриклеточного кальция. Таким образом, P2X₁ рецептор-опосредованный быстрый приток кальция вызывает изменение формы тромбоцитов, но он не играет никакой существенной роли в ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов. Быстрая активация и ответ на этот рецептор, вероятно, важны в случае больших скоростей течения крови, из-за задержки появления других активаторов [34].

Стимуляция P2X₁-рецептора при помощи АТР зависит от концентрации агониста. Так, низкая концентрация вызывает пик ответа через несколько секунд, который может быть устойчив в течение более 30 сек. Это свойство может внести свой вклад в способность P2X₁ поддерживать уровень Ca²⁺ и секреции во время стимуляции более мощных агонистов тромбоцитов [40]. В противоположность этому (при максимальных концентрациях агониста) активация P2X₁ рецептора происходит в течении десятков миллисекунд, а его полная десенсибилизация проходит в течение нескольких секунд [41].

Тромбоциты мышей, лишенных P2X₁-рецепторов, не проявляли нормальной агрегации, секреции, адгезии, роста тромбов и имели низкую смертность [42]. Такие мыши демонстрировали устойчивость к тромбоэмболии при введении коллагена и адреналина [33]. А трансгенные мыши с повышенной экспрессией этого рецептора обладали повышенной чувствительностью тромбоцитов на малые концентрации коллагена и ТхА₂, несмотря на нормальный ответ на ADP и тромбин [43], демонстрируя при этом увеличенную смертность. Важно отметить, что в одном сравнительном исследовании P2X₁^{-/-}, P2Y₁^{-/-} и P2Y₁₂^{-/-} мышей [44], уменьшение площади тромба после потери P2X₁ (снижение до ≈23 % от контроля) было также велико, как и при отсутствии либо P2Y₁, либо P2Y₁₂ рецептора. Все это указывает на то, что P2 пуринорецепторы тромбоцитов представляют собой потенциально важную мишень для антитромботической терапии.

Роль ионов кальция в активации тромбоцитов. Ионы кальция являются необходимым внеклеточным фактором не только для активации гликопротеина, но и важным внутриклеточным регулятором. Резкое нарастание концентрации этих ионов в цитоплазме играет ключевую роль в определении функциональной активности тромбоцитов, связанной с их агрегацией и реакцией высвобождения, а снижение – с дезагрегацией.

Вход ионов кальция в цитоплазму и активация тромбоцитов осуществляется 2 путями: трансмембранно из внеклеточного пространства и из внутриклеточных депо, представленных рецептор-опосредованными ионными каналами (receptor-mediated Ca²⁺ entry; RMCE) [45] и обратными Na⁺/Ca²⁺-обменниками (Na⁺/Ca²⁺ exchanger; NCX).

Существуют следующие типы RMCE-каналов: рецептор-управляемые каналы (receptor-operated channel; ROC), вторично-управляемые каналы (second messenger-operated channel; SMOC) и депо-управляемые кальциевые каналы (store-operated calcium channel; SOCC) [46]. К ROC относятся пуринорецепторы тромбоцитов и другие рецепторы плазматической мембраны. SMOC открываются с помощью таких специфических вторичных посредников, как фосфолипаза C и инозитолфосфат. Данные типы рецепторов способствуют притоку кальция из внутриклеточных депо (P2Y₁, IP₃R). SOC каналы способствуют притоку кальция из внутренних депо (плотной трубчатой системы и кислотных органелл) и активируются при изменении внутриклеточной [Ca²⁺].

Механизмы депо-зависимого поступления ионов кальция в цитоплазму. Механизм секреции кальция из внутриклеточных хранилищ был назван депо-управляемым поступлением кальция (store-operated calcium entry; SOCE). Функционирование SOCE осуществляется за счет молекулы взаимодействия стромы 1 (stromal interaction molecule 1; STIM1), являющейся Ca²⁺ сенсорной молекулой. STIM1 содержит два N-концевых EF домена в просвете DTS, способных связывать ионы кальция. После опустошения депо, это связывание нарушается и STIM1 перераспределяет и открывает SOC каналы в мембране [47].

SOC каналы способствуют притоку кальция из внеклеточного пространства, активируясь в результате истощения Ca²⁺ во внутриклеточных хранилищах, вызываемого посредством стимуляции поверхностных рецепторов. В качестве SOC каналов в тромбоцитах выступают члены семейства каналов переходного рецепторного потенциала (transient receptor potential) (TRP). Известно, что фосфатидилинозитол 3-киназы и фосфатидилинозитол 4-киназы (PI₃K и PI₄K) и внеклеточная-регулируемая киназа (extracellular signal-regulated kinase; ERK) участвуют во входе внеклеточного Ca²⁺, путем активации Ca²⁺-проницаемого канала и TRPC1 (transient receptor potential channel 1), связываясь с IP₃R типа II [48]. В тромбоцитах также существует TRPC6, осуществляющий перенос ионов кальция из внеклеточного пространства, и было продемонстрировано, что он формируется без SOC канала [49].

Кроме того, было обнаружено, что в мышечных мегакариоцитах, тромбоцитах человека и мегакариоцитарных клеточных линиях наблюдались высокие уровни экспрессии белка Orai1 (calcium release-activated calcium channel protein 1), даже выше, чем у других членов семейства каналов переходного рецепторного потенциала [50]. Позже, было подтверждено, что Orai1 является основным SOC каналом на поверхности тромбоцитов [51].

Принимая во внимание тот факт, что тромбоциты, в отличие от большинства других не возбудимых клеток, должны очень быстро реагировать на раздражители, то вполне вероятно, что основные клеточные функции должны регулироваться без задержки. Таким образом, SOCE может иметь особое значение для таких процессов, происходящих после адгезии, как первичная активация и агрегация, стабилизация тромба и, возможно, скопления других клеток в месте повреждения.

Таким образом, притока ионов Ca^{2+} из внеклеточного пространства и его высвобождение из внутриклеточных депо оказывается достаточным, чтобы вызвать большинство таких ответов, как изменение формы, активации и секреции гранул [14].

Ca^{2+} -зависимые процессы активации тромбоцитов. Поступление внеклеточного кальция в цитоплазму активирует фосфолипазу A_2 . Фосфолипаза A_2 (PLA_2) относится к надсемейству ферментов, которые катализируют гидролиз мембранных фосфолипидов по sn-2 положению, с образованием свободных жирных кислот и лизофосфолипидов [52]. Из известных четырех типов PLA_2 : секреторной (sPLA_2), цитозольной Ca^{2+} -зависимой (cPLA_2), цитозольной Ca^{2+} -независимой (iPLA_2) и липопротеин-ассоциированной (Lp-PLA_2) для изучения процессов активации тромбоцитов наибольший интерес представляет подгруппа кальций-зависимых фосфолипаз, а именно – GIVA PLA_2 (group IVA PLA_2). Эта фосфолипаза – единственная из представленных выше разновидностей обладает повышенным сродством к арахидоновой кислоте в sn-2 положении вследствие наличия активного сайта связывания для серина и аспарагиновой кислоты [53]. Таким образом, в тромбоцитах при действии GIVA PLA_2 на фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин высвобождается преимущественно арахидоновая кислота [53], которая служит субстратом для синтеза ряда биологически активных веществ.

Дальнейшее превращение арахидоновой кислоты зависит от циклооксигеназ (COX), липоксигеназ и специфических синтетаз, способных превращать продукты циклооксигеназ и липоксигеназ в биологически эйкозаноиды. Так, простагландины образуются при участии циклооксигеназ, лейкотриены и липоксигены – липоксигеназ.

Молекулярные механизмы дезактивации тромбоцитов. Для перехода тромбоцитов в состояние покоя необходимо уменьшение в них уровня цитоплазматического кальция. Отток ионов кальция из цитозоля во внеклеточное пространство осуществляется за счет Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны (plasma membrane Ca^{2+} ATPase; PMCA) [54] и двух изоформ SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) (SERCA2b и SERCA3) [55], находящихся на поверхности кислотных органелл и тубулярной системы и способствующих возвращению Ca^{2+} во внутриклеточные депо.

Следует отметить, что активность PMCA регулируется с помощью нескольких механизмов, в том числе Ca^{2+} /кальмодулин, фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат, протеинкиназы А и С, а также под действием протеаз [56]. При связывании четырех ионов Ca^{2+} со специфическим белком – кальмодулином образуется комплекс (Ca^{2+} -кальмодулин), обладающий способностью активировать киназу легких цепей миозина, а также фосфорилировать аденилатциклазу и протеинкиназу (за счет Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеинкиназ). Это приводит к снижению их ферментативной активности и уменьшению внутриклеточного содержания сАМР и сGMP.

Антагонистические эффекты сАМР и сGMP опосредованы через сАМР- и сGMP-зависимые протеинкиназы (PKA и PKG), которые фосфорилируют субстратный белок, IP_3RI , ингибируя мобилизацию кальция [57]. А взаимодействие комплекса Ca^{2+} -кальмодулин с фосфодиэстеразой сАМР, напротив, вызывает стимуляцию активности этого фермента и, как следствие, ускоренный метаболизм сАМР до неактивного АМР. Следовательно, общий тромбоцитарный ответ является последствием совокупности всех вышеупомянутых реакций.

Заключение

Суммируя вышесказанное, можно заключить, что для выполнения гемостатической функции, тромбоциты обладают различными адгезивными молекулярными комплексами на мембранной поверхности, специфическими рецепторными структурами и сложными, сопряженными регуляторными механизмами для реализации ответов как на определенные наборы стимулов, так и на строго специфические отдельные сигналы, приводящие вначале к адгезии и агрегации, а также к последующим процессам дезактивации, дезагрегации. Хотя инициирующие агрегацию агонисты могут отличаться по своим характеристикам и действовать на разные рецепторы тромбоцитов, вызывая активацию различных сигнальных путей, общий результат их действия сводится к изменению в цитоплазме концентрации свободных ионов кальция, секреции биологически активных соединений из внутриклеточных структур, запуску синтеза тех или иных разновидностей эйкозаноидов, способствующих в совокупности, активации или дезактивации, по мере необходимости, кровяных пластинок.

Библиографические ссылки

1. Eskin S. G., McIntire L. V. Rheology of Thrombosis // Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice / Lippincott Williams & Wilkins; ed. R.W. Colman. Pub. 5th ed. Philadelphia, PA. 2006.
2. Струкова С. М. Современные представления о механизмах свертывания крови // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2002. № 2. С. 21–27.
3. Li R., Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex // J. Thromb. Haemost. 2013. Vol. 11, № 4. P. 605–614.
4. Schmugge M., Rand M. L., Freedman J. Platelets and von Willebrand factor // Transfus. Apher. Sci. 2003. Vol. 28, № 3. P. 269–277.
5. Canobbio I., Balduini C., Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex // Cell. Signal. 2004. Vol. 16, № 12. P. 1329–1344.
6. Шатурный В. И., Шахиджанов С. С., Свешникова А. Н. и др. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови // Биомед. химия. 2014. Т. 60, № 2. С. 182–200.
7. Moroi M., Jung S. M. Platelet glycoprotein VI: its structure and function // Thromb. Res. 2004. Vol. 114, № 4. P. 221–233.
8. Plow E. F., Pesho M. M., Ma Y.-Q. Integrin α IIb β 3 // Platelets (Second Edition) – Academic Press; ed. A. D. Michelson. Burlington, 2007.
9. French D. L., Seligsohn U. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors and Glanzmann's Thrombasthenia // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000. Vol. 20, № 3. P. 607–610.
10. Liu M.-Y., Ren Y.-P., Wei W.-L. et al. Changes of Serotonin (5-HT), 5-HT_{2A} Receptor, and 5-HT Transporter in the Sprague-Dawley Rats of Depression, Myocardial Infarction and Myocardial Infarction Co-exist with Depression // Chin. Med. J. (Engl.). 2015. Vol. 128, № 14. P. 1905–1909.
11. Honda Z., Nakamura M., Miki I., et al. Cloning by Functional Expression of Platelet-Activating Factor Receptor from Guinea-Pig Lung // Nature. 1991. Vol. 369, № 6307. P. 342–346.
12. Jennings L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis // Thromb Haemost. 2009. Vol. 102, № 2. P. 248–257.
13. Abe T., Takeuchi K., Takahashi N., et al. Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction, and intrarenal expression localization // J. Clin. Invest. 1995. Vol. 96, № 2. P. 657–664.
14. Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. Calcium signaling in platelets // J. Thromb. Haemost. 2009. Vol. 7, № 7. P. 1057–1066.
15. Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003. Vol. 4, № 7. P. 517–529.
16. McNicol A., Shibou T. S., Pampolina C., et al. Incorporation of map kinases into the platelet cytoskeleton // Thromb. Res. 2001. Vol. 103, № 1. P. 25–34.
17. Ohlmann P., Eckly A., Freund M., et al. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of G α_q // Blood. 2000. Vol. 96, № 6. P. 2134–2139.
18. Huang J. S., Ramamurthy S. K., Lin X., et al. Cell signalling through thromboxane A₂ receptors // Cell. Signal. 2004. Vol. 16, № 5. P. 521–533.
19. Gratacap M. P., Payrastré B., Nieswandt B., et al. Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 51. P. 47906–47913.
20. Ghoshal K., Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis // Sci. World J. 2014. P. 1–16.
21. Knights K. M., Mangoni A. A., Miners J. O. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity // Expert Rev. Clin. Pharmacol. 2010. Vol. 3, № 6. P. 769–776.
22. Kahn M. L., Zheng Y. W., Huang W., et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation // Nature. 1998. Vol. 394, № 6694. P. 690–694.
23. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history // Thromb. Res. 2012. Vol. 129, № 3. P. 250–256.
24. Stalker T. J., Newman D. K., Ma P., et al. Platelet Signaling // Handb. Exp. Pharmacol. 2012. № 210. P. 59–85.
25. Kennedy C. The discovery and development of P₂ receptor subtypes // J. Auton. Nerv. Syst. 2000. Vol. 81, № 1. P. 158–163.
26. Clifford E. E., Parker K., Humphreys B. D., et al. The P_{2X}₁ Receptor, an Adenosine Triphosphate-Gated Cation Channel, Is Expressed in Human Platelets but not in Human Blood Leukocytes // Blood. 1998. Vol. 91, № 9. P. 3172–3181.
27. Rozalski M., Nocun M., Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets-potential new targets for antiplatelet therapy // ACTA Biochim. Pol. 2005. Vol. 52, № 2. P. 411–415.
28. Brass L. F., Stalker T. J. Mechanisms of platelet activation // Platelets Hematol. Cardiovasc. Disord. Camb. Univ. Press. 2008. P. 37–52.
29. Léon C., Hechler B., Freund M., et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P_{2Y}₁₂ receptor-null mice // J. Clin. Invest. 1999. Vol. 104, № 12. P. 1731–1737.
30. Remijn J. A., Wu Y. P., Jeninga E. H., et al. Role of ADP Receptor P_{2Y}₁₂ in Platelet Adhesion and Thrombus Formation in Flowing Blood // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002. Vol. 22, № 4. P. 686–691.
31. Foster C. J., Prosser D. M., Agans J. M., et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs // J. Clin. Invest. 2001. Vol. 107, № 12. P. 1591–1598.
32. Daniel J. L., Dangelmaier C., Jin J., et al. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on platelets // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273, № 4. P. 2024–2029.
33. Hechler B., Lenain N., Marchese P., et al. A Role of the Fast ATP-gated P_{2X}₁ Cation Channel in Thrombosis of Small Arteries In Vivo // J. Exp. Med. 2003. Vol. 198, № 4. P. 661–667.
34. Toth-Zsomboki E., Oury C., Cornelissen H., et al. P_{2X}₁-mediated ERK₂ Activation Amplifies the Collagen-induced Platelet Secretion by Enhancing Myosin Light Chain Kinase Activation // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 47. P. 46661–46667.
35. Oury C., Toth-Zsomboki E., Vermeylen J., et al. P_{2X}₁-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen // Blood. 2002. Vol. 100, № 7. P. 2499–2505.

36. Mahaut-Smith M. P., Jones S., Evans R. J. The P2X1 receptor and platelet function // *Purinergic Signal*. 2011. Vol. 7, № 3. P. 341–356.
37. Bergmeier W., Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets // *J. Thromb. Haemost.* 2009. Vol. 7. P. 187–190.
38. Vial C., Rolf M. G., Mahaut-Smith M. P., et al. A study of P2X1 receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors // *Br. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 135, № 2. P. 363–372.
39. Jin J., Kunapuli S. P. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. Vol. 95, № 14. P. 8070–8074.
40. Fung C. Y. E., Cendana C., Farndale R. W., et al. Primary and secondary agonists can use P2X1 receptors as a major pathway to increase intracellular Ca²⁺ in the human platelet // *J. Thromb. Haemost.* 2007. Vol. 5, № 5. P. 910–917.
41. Valera S., Hussy N., Evans R. J., et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP // *Nature*. 1994. Vol. 371, № 6497. P. 516–519.
42. Hechler B., Nonne C., Roh E. J., et al. MRS2500 [2-Iodo-N6-methyl-(N)-methanocarpa-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a Potent, Selective, and Stable Antagonist of the Platelet P2Y1 Receptor with Strong Antithrombotic Activity in Mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. Vol. 316, № 2. P. 556–563.
43. Oury C., Kuijpers M. J., Toth-Zsomboki E., et al. Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype // *Blood*. 2003. Vol. 101, № 10. P. 3969–3976.
44. Erhardt J. A., Toomey J. R., Douglas S. A., et al. P2X1 stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation // *J. Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 4, № 4. P. 882–890.
45. Dobrydyneva Y., Williams R. L., Blackmore P. F. Trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets // *Br. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 128, № 1. P. 149–157.
46. Sage S. The Wellcome Prize Lecture. Calcium entry mechanisms in human platelets // *Exp. Physiol.* 1997. Vol. 82, № 5. P. 807–823.
47. Liou J., Kim M. L., Heo W. D., et al. STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx // *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15, № 13. P. 1235–1241.
48. Rosado J. A., Sage S. O. The ERK Cascade, a New Pathway Involved in the Activation of Store-Mediated Calcium Entry in Human Platelets // *Trends Cardiovasc. Med.* 2002. Vol. 12, № 5. P. 229–234.
49. Hassock S. R., Zhu M. X., Trost C., et al. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC₆ forms the store-independent calcium entry channel // *Blood*. 2002. Vol. 100, № 8. P. 2801–2811.
50. Tolhurst G., Carter R. N., Amisten S., et al. Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes // *Platelets*. 2008. Vol. 19, № 4. P. 308–313.
51. Authi K. S. Orai1: a channel to safer antithrombotic therapy // *Blood*. 2009. Vol. 113, № 9. P. 1872–1873.
52. Burke J. E., Dennis E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling // *J. Lipid Res.* 2009. Vol. 50. P. S237–S242.
53. Ghosh M., Tucker D. E., Burchett S. A., et al. Properties of the Group IV phospholipase A2 family // *Prog. Lipid Res.* 2006. Vol. 45, № 6. P. 487–510.
54. Rosado J. A., Sage S. O. Regulation of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase by Small GTPases and Phosphoinositides in Human Platelets // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 26. P. 19529–19535.
55. Cavallini L., Coassin M., Alexandre A. Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin // *Biochem. J.* 1995. Vol. 310, № 2. P. 449–452.
56. Monteith G. R., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump – a physiological perspective on its regulation // *Cell Calcium*. 1995 Vol. 18, № 6. P. 459–470.
57. Schwarz, U. R. Walter U., Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides I // *Biochem. Pharmacol.* 2001. Vol. 62, № 9. P. 1153–1161.

References

1. Eskin S. G., McIntire L. V. Rheology of Thrombosis. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice / Lippincott Williams & Wilkins; ed. R.W. Colman. Pub. 5th ed. Philadelphia, PA. 2006.
2. Strukova S. M. Modern ideas about the mechanisms of blood clotting. *Trombs, Bleeding and Diseases of Vessels*. 2002. No. 2. P. 21–27 (in Russ.).
3. Li R., Emsley J. The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib–IX–V complex. *J. Thromb. Haemost.* 2013. Vol. 11, No. 4. P. 605–614.
4. Schmutz M., Rand M. L., Freedman J. Platelets and von Willebrand factor. *Transfus. Apher. Sci.* 2003. Vol. 28, No. 3. P. 269–277.
5. Canobbio I., Balduini C., Torti M. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. *Cell. Signal.* 2004. Vol. 16, No. 12. P. 1329–1344.
6. Shaturny V., Shakhidzhanov S., Sveshnikova A., et al. Activators, receptors and intracellular signaling pathways in blood platelets. *Biomedical Chemistry*. 2014. T. 60, No. 2. P. 182–200.
7. Moroi M., Jung S. M. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb. Res.* 2004. Vol. 114, No. 4. P. 221–233.
8. Plow E. F., Pesho M. M., Ma Y.-Q. Integrin α Ib β 3 // *Platelets (Second Edition)* – Academic Press; ed. A. D. Michelson. Burlington, 2007.
9. French D. L., Seligsohn U. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors and Glanzmann's Thrombasthenia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. Vol. 20, No. 3. P. 607–610.
10. Liu M.-Y., Ren Y.-P., Wei W.-L. et al. Changes of Serotonin (5-HT), 5-HT_{2A} Receptor, and 5-HT Transporter in the Sprague-Dawley Rats of Depression, Myocardial Infarction and Myocardial Infarction Co-exist with Depression. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2015. Vol. 128, No. 14. P. 1905–1909.
11. Honda Z., Nakamura M., Miki I., et al. Cloning by Functional Expression of Platelet-Activating Factor Receptor from Guinea-Pig Lung. *Nature*. 1991. Vol. 369, No. 6307. P. 342–346.

12. Jennings L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009. Vol. 102, No. 2. P. 248–257.
13. Abe T., Takeuchi K., Takahashi N., et al. Rat kidney thromboxane receptor: molecular cloning, signal transduction, and intrarenal expression localization. *J. Clin. Invest.* 1995. Vol. 96, No. 2. P. 657–664.
14. Varga-Szabo D., Braun A., Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2009. Vol. 7, No. 7. P. 1057–1066.
15. Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 4, No. 7. P. 517–529.
16. McNicol A., Shibui T. S., Pampolina C., et al. Incorporation of map kinases into the platelet cytoskeleton. *Thromb. Res.* 2001. Vol. 103, No. 1. P. 25–34.
17. Ohlmann P., Eckly A., Freund M., et al. ADP induces partial platelet aggregation without shape change and potentiates collagen-induced aggregation in the absence of Gαq. *Blood.* 2000. Vol. 96, No. 6. P. 2134–2139.
18. Huang J. S., Ramamurthy S. K., Lin X., et al. Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell. Signal.* 2004. Vol. 16, No. 5. P. 521–533.
19. Gratacap M. P., Payrastra B., Nieswandt B., et al. Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, No. 51. P. 47906–47913.
20. Ghoshal K., Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *Sci. World J.* 2014. P. 1–16.
21. Knights K. M., Mangoni A. A., Miners J. O. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 2010. Vol. 3, No. 6. P. 769–776.
22. Kahn M. L., Zheng Y. W., Huang W., et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998. Vol. 394, No. 6694. P. 690–694.
23. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: A short history. *Thromb. Res.* 2012. Vol. 129, No. 3. P. 250–256.
24. Stalker T. J., Newman D. K., Ma P., et al. Platelet Signaling. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012. No. 210. P. 59–85.
25. Kennedy C. The discovery and development of P2 receptor subtypes. *J. Auton. Nerv. Syst.* 2000. Vol. 81, No. 1. P. 158–163.
26. Clifford E. E., Parker K., Humphreys B. D., et al. The P2X₁ Receptor, an Adenosine Triphosphate-Gated Cation Channel, Is Expressed in Human Platelets but not in Human Blood Leukocytes. *Blood.* 1998. Vol. 91, No. 9. P. 3172–3181.
27. Rozalski M., Nocun M., Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets-potential new targets for antiplatelet therapy. *ACTA Biochim. Pol.* 2005. Vol. 52, No. 2. P. 411–415.
28. Brass L. F., Stalker T. J. Mechanisms of platelet activation. Platelets Hematol. Cardiovasc. Disord. Camb. Univ. Press. 2008. P. 37–52.
29. Léon C., Hechler B., Freund M., et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P₂Y₁ receptor-null mice. *J. Clin. Invest.* 1999. Vol. 104, No. 12. P. 1731–1737.
30. Remijn J. A., Wu Y. P., Jenning E. H., et al. Role of ADP Receptor P₂Y₁₂ in Platelet Adhesion and Thrombus Formation in Flowing Blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. Vol. 22, No. 4. P. 686–691.
31. Foster C. J., Prosser D. M., Agans J. M., et al. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J. Clin. Invest.* 2001. Vol. 107, No. 12. P. 1591–1598.
32. Daniel J. L., Dangelmaier C., Jin J., et al. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on platelets. *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, No. 4. P. 2024–2029.
33. Hechler B., Lenain N., Marchese P., et al. A Role of the Fast ATP-gated P2X₁ Cation Channel in Thrombosis of Small Arteries In Vivo. *J. Exp. Med.* 2003. Vol. 198, No. 4. P. 661–667.
34. Toth-Zsomboki E., Oury C., Cornelissen H., et al. P2X₁-mediated ERK2 Activation Amplifies the Collagen-induced Platelet Secretion by Enhancing Myosin Light Chain Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, No. 47. P. 46661–46667.
35. Oury C., Toth-Zsomboki E., Vermeylen J., et al. P2X₁-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. *Blood.* 2002. Vol. 100, No. 7. P. 2499–2505.
36. Mahaut-Smith M. P., Jones S., Evans R. J. The P2X₁ receptor and platelet function. *Purinergic Signal.* 2011. Vol. 7, No. 3. P. 341–356.
37. Bergmeier W., Stefanini L. Novel molecules in calcium signaling in platelets. *J. Thromb. Haemost.* 2009. Vol. 7. P. 187–190.
38. Vial C., Rolf M. G., Mahaut-Smith M. P., et al. A study of P2X₁ receptor function in murine megakaryocytes and human platelets reveals synergy with P2Y receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 135, No. 2. P. 363–372.
39. Jin J., Kunapuli S. P. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. Vol. 95, No. 14. P. 8070–8074.
40. Fung C. Y. E., Cendana C., Farndale R. W., et al. Primary and secondary agonists can use P2X₁ receptors as a major pathway to increase intracellular Ca²⁺ in the human platelet. *J. Thromb. Haemost.* 2007. Vol. 5, No. 5. P. 910–917.
41. Valera S., Hussy N., Evans R. J., et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature.* 1994. Vol. 371, No. 6497. P. 516–519.
42. Hechler B., Nonne C., Roh E. J., et al. MRS2500 [2-Iodo-N⁶-methyl-(N)-methanocarba-2'-deoxyadenosine-3',5'-bisphosphate], a Potent, Selective, and Stable Antagonist of the Platelet P2Y₁ Receptor with Strong Antithrombotic Activity in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. Vol. 316, No. 2. P. 556–563.
43. Oury C., Kuijpers M. J., Toth-Zsomboki E., et al. Overexpression of the platelet P2X₁ ion channel in transgenic mice generates a novel prothrombotic phenotype. *Blood.* 2003. Vol. 101, No. 10. P. 3969–3976.
44. Erhardt J. A., Toomey J. R., Douglas S. A., et al. P2X₁ stimulation promotes thrombin receptor-mediated platelet aggregation. *J. Thromb. Haemost.* 2006. Vol. 4, No. 4. P. 882–890.
45. Dobrydneya Y., Williams R. L., Blackmore P. F. trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *Br. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 128, No. 1. P. 149–157.
46. Sage S. The Wellcome Prize Lecture. Calcium entry mechanisms in human platelets. *Exp. Physiol.* 1997. Vol. 82, No. 5. P. 807–823.
47. Liou J., Kim M. L., Heo W. D., et al. STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15, No. 13. P. 1235–1241.
48. Rosado J. A., Sage S. O. The ERK Cascade, a New Pathway Involved in the Activation of Store-Mediated Calcium Entry in Human Platelets. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002. Vol. 12, No. 5. P. 229–234.

49. Hassock S. R., Zhu M. X., Trost C., et al. Expression and role of TRPC proteins in human platelets: evidence that TRPC₆ forms the store-independent calcium entry channel. *Blood*. 2002. Vol. 100, No. 8. P. 2801–2811.
50. Tolhurst G., Carter R. N., Amisten S., et al. Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets*. 2008. Vol. 19, No. 4. P. 308–313.
51. Authi K. S. Orai1: a channel to safer antithrombotic therapy. *Blood*. 2009. Vol. 113, No. 9. P. 1872–1873.
52. Burke J. E., Dennis E. A. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res*. 2009. Vol. 50. P. S237–S242.
53. Ghosh M., Tucker D. E., Burchett S. A., et al. Properties of the Group IV phospholipase A₂ family. *Prog. Lipid Res*. 2006. Vol. 45, No. 6. P. 487–510.
54. Rosado J. A., Sage S. O. Regulation of Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase by Small GTPases and Phosphoinositides in Human Platelets. *J. Biol. Chem*. 2000. Vol. 275, No. 26. P. 19529–19535.
55. Cavallini L., Coassin M., Alexandre A. Two classes of agonist-sensitive Ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochem. J*. 1995. Vol. 310, No. 2. P. 449–452.
56. Monteith G. R., Roufogalis B. D. The plasma membrane calcium pump – a physiological perspective on its regulation. *Cell Calcium*. 1995 Vol. 18, No. 6. P. 459–470.
57. Schwarz, U. R. Walter U., Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem. Pharmacol*. 2001. Vol. 62, No. 9. P. 1153–1161.

Статья поступила в редколлегию 21.11.2017
Received by editorial board 21.11.2017